



Dynamique et mise en place des mécanismes
associés à l'élaboration de la banane :
Étude du mécanisme des acides organiques.

Emilie Bernard

Soutenu le 12/09/12

Maître de stage : Didier MBEGUIE-A-MBEGUIE

Lieu de stage : CIRAD Station Neufchâteau, Guadeloupe

Master 2 Génomique et Productivité Végétale

2011-2012

Résumé :

La banane est l'une des principales denrées mondiales. En vu de l'augmentation de la population, il est nécessaire d'améliorer sa production dans des conditions respectueuses de l'environnement tout en préservant sa qualité. En effet, aujourd'hui la banane commerciale, Cavendish (*Musa acuminata*), rencontre des problèmes sanitaires tels que la *cercosporiose* jaune et noire, mais elle est aussi confrontée à des problèmes liés au contraintes de commercialisation (transport, durée de vie commerciale, etc..). Ainsi, pour remédier à ces problèmes, il est important de connaître les différents mécanismes de la mise en place de la banane (du planting à l'assiette). Le travail effectué dans le cadre de ce stage à été de comprendre le processus de maturation post-récolte des bananes Cavendish dans le but de garder leurs qualités organoleptiques. L'étude c'est donc portée sur deux acides organiques impliqués dans la maturation ; la malate synthase et l'aconitase, enzyme responsable de la mise en place du malate et du citrate respectivement. Ces deux enzymes affectent le goût de la banane au cours de la maturation en induisant l'acidité. Pour ce faire, un suivi post-récolte à différents stades, déterminé par la production éthylénique, a été effectué. Les résultats connus dans la littérature n'ont pas été validés suite à une grande variation intra-régime. Afin de pallier à ces disparités, un nouveau protocole a été mis en place.

Mots clés : Banane (*Musa acuminata*), maturation, qualité, malate synthase, aconitase.

Abstract:

The banana is one of the main food worlds. In view of the increase population, it is necessary to improve its production under environmentally friendly while maintaining its quality. Indeed, today the commercial banana, Cavendish (*Musa acuminata*) meets health problems such as yellow and black *cercosporiose*, but it also faces problems related to marketing constraints (transport, shelf life, etc...). Thus, to overcome these problems, it is important to know the different mechanisms of the development of the banana (from planting to plate). In my internship was understand the process of post-harvest maturation of Cavendish bananas in order to keep their organoleptic qualities. This study focused on two organic acids involved in the maturation; malate synthase and aconitase, enzyme responsible for the implementation of malate and citrate respectively. These two enzymes affect the taste of the banana during ripening by inducing acidity. To do this, a follow post-harvest to different stages, determined by ethylene production was made. Known results in the literature have not been validated due to a large variation within the regime. To overcome these differences, a new protocol was implemented.

Keywords: Banana (*Musa acuminata*), maturation, quality, malate synthase, aconitase.

Remerciement

Je tiens à exprimer mes remerciements à mon maître de stage Didier MBEGUIE-A-MBEGUIE pour son sens de la pédagogie sans lequel je n'aurais pas pu comprendre aussi bien mon sujet de stage ainsi que pour m'avoir accordé sa confiance dès le début. Merci aussi pour ton soutien professionnel et personnel (pour tout ce qui m'est arrivée de déroutant/singulier/inattendu durant ce stage !) et pour m'avoir toujours encouragée à valoriser mes résultats. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, nos fou-rires et nos moments plus sérieux qui m'ont permis d'avancer constructivement.

Mes remerciements vont également à Olivier HUBERT pour m'avoir formée aux méthodes de biochimies (BRIX et Acidité titrable), ainsi que pour sa disponibilité lors de mes questionnements et son sourire quotidien.

Je remercie en général toute l'équipe de qualité et ceux du projet INTEREG/CABARE pour leurs aides, leurs conseils et leurs bonnes humeurs qui fondent, le laboratoire de biologie moléculaire, un endroit où il fait bon de travailler.

Merci aux VSC et stagiaires et plus particulièrement Xavounet, La Gueunon, Paupau Sucré, Lilou et Louisse pour les bons moments (fou-rires, repas, ballades...) passés dans ce pays inconnu au départ et vos encouragements quand le moral semblait baisser.

Vous allez me manquer terriblement mais les discussions partagées lors de nos retrouvailles futures nous aiderons à relativiser sur nos difficultés et à construire notre vie qui ne fait que commencer.

Je remercie Sébastien RICCI qui a été mon soutien au début en Guadeloupe.

Je tiens à remercier aussi Pascale, Chantal et Louisiane pour nos discussions et nos rires dès l'aube qui m'ont permis de bien entamer mes journées.

Je rentre donc avec pleins d'heureux souvenirs, enrichie personnellement, professionnellement et le cœur gros comme ça !

Abréviations

°C : Degré Celsius
ACC : Acide 1-AminoCyclopropane-1-Carboxilique
AcNa : Aconitase
ACO : ACC oxidase
ACS : ACC synthase
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN : Acide RiboNucléique
BET : Bromure d'Ethidium
CAC: Clathrin Adaptor Complexes medium
DEPC: Diethylpyrocarbonate
DIECA: Diethyldithiocarbamic Acid
DJ: Degré Jour
DNase : Deoxyribonuclease
DO: Densité Optique
DTT : Dithiothreitol
DVV : Durée de Vie Verte
EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid
H₂O : Dioxyde d'hydrogène
HT: Hors Traitement
KCl : Chlorure de potassium
LiCl : lithium chloride
M: Molaire
MgCl₂ : Chloride de Magnésium
Min : Minutes
MOPS: 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MS: Malate Synthase
PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne
PEPC : Phosphoénolpyruvate Carboxylase
PJB : Pisang Jary Bouaya
PL : Pisang liling
PPCO: Polypropylène Colpolymère
Ppm: Partie par million
PVP : Polyvinylpyrrolidone
Q-PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative en temps réel
qsp : quantité suffisante pour
RAN: GTP-binding nuclear protein
Rpm: Rotation par minute
RPS: Ribosomal protein S
RT : Reverse transcription
SAMDC1: s-Adenosyl methionine decarboxylase
SDS: Dodécylsulfate de sodium
Sec : Secondes
TBE : Tris/Borate/EDTA

Glossaire

Autocatalytique : Réaction chimique dont le catalyseur figure parmi les produits de la réaction.

Bractée : Pièce florale qui se trouve à la base de l'inflorescence et qui entoure la base du pédoncule.

Calibrant : Le calibrateur est l'échantillon auquel tous les autres sont comparés.

Cymes : Mode d'inflorescence constitué par un axe principal (le rachis) à l'extrémité duquel se trouve une fleur.

Hermaphrodite : Qualifie une fleur possédant à la fois des étamines et des carpelles fonctionnels.

Inflorescence : Disposition des fleurs sur la tige d'une plante à fleur.

Main : Fruit du bananier. Banane.

Organoleptique : Caractère d'une substance pouvant affecter un récepteur sensoriel.

Parthénocarpiques : les bananiers à fruits parthénocarpiques se multiplient végétativement par enracinement de leurs ramifications latérales.

Polytron : Broyeur manuel.

Régime : Inflorescence du bananier en fruits.

Zygomorphe : Se dit d'une fleur symétrique par rapport à un plan. Se dit d'une fleur à symétrie bilatérale. S'oppose à actinomorphe.

Liste des illustrations

Figure 1 : Représentation de l'organisation du bananier (Champion, 1963).

Figure 2: [Dessin d'une coupe transversale d'un ovaire de bananier](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/banane.htm)

(<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/banane.htm>).

Figure 3: Schéma des phases de croissance du fruit (Lassoudière, 2007).

Figure 4: Schéma des phases du développement et de la maturation de la banane caractérisées par l'évolution de la couleur de la peau (courbe en gras noir). En abscisse, temps en jours et en ordonnées stade de l'échelle colorimétrique (Lassoudière, 2007).

Figure 5: Stade de maturation des fruits du bananier (Lassoudière, 2007).

Figure 6: Voies de la biosynthèse et du métabolisme de l'éthylène (Prasanna et al., 2007).

Figure 7: Evolution de l'amidon, des sucres totaux, des extraits secs solubles et de l'acidité titrable dans la pulpe de la banane au cours de la maturation (Madamba et al., 1977).

Figure 8: Voie métabolique du malate dans les cellules du fruit Sweetman et al., 2009).

Figure 9: Voie métabolique du citrate (Degu et al., 2011).

Figure 10: Evolution du BRIX au cours de la maturation post-récolte des fruits récoltés à différents stades de développement en vert chez la Cavendish.

Figure 11: Evolution de l'acidité titrable au cours de la maturation post-récolte des fruits récoltés à différents stades de développement en vert chez la banane Cavendish.

Figure 12: Analyse qualitative des ARN totaux par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant. a. Profils d'électrophorèse d'ARN totaux extraits au tampon d'extraction contenant du DIECA. b. ARN totaux extraits au tampon d'extraction sans sodium deoxycholate.

Figure 13: Courbe obtenue au nanodrop et représentative de deux extraits d'ARN différents l'un dégradé (courbe a) et l'autre non dégradé (courbe b).

Figure 14: Gel d'agarose représentant la qualité de certains extraits d'ARN. a. ARN correcte. b. pas ou peu d'ARN présent. c. ARN non dégradé.

Figure 15: Résultats de l'amplification de l'actine pour la vérification du traitement DNase. Ladder 1Kb. a. témoin négatif. b. témoin positif.

Figure 16: Résultat de l'amplification pour la vérification d'obtention de cDNA. a. amplification de la peau avec des gènes de référence spécifique (CAC et SAMDC1). b. amplification de la pulpe avec des gènes de référence spécifique (RAN et RSP2).

Figure 17: Amplification de gènes de référence pour tester les conditions PCR compatibles à l'ensemble des gènes utilisés. De la gauche vers la droite CAC, SAMDC1, RAN, RSP2.

Figure 18: Amplification de gènes expérimentaux pour tester les conditions PCR compatibles à l'ensemble des gènes utilisés. De la gauche vers la droite CTR1, EIL6, EIL4, EIL4sp, EIL3, EIL2, EIL1, ACS, ACO, MS, ERS2, AcNa.

Tableau 1 : Classification et répartition géographique des principaux bananier cultivés (Bakry *et al*, 1997).

Tableau 2: Bilan de l'efficacité des amorces par gène et par variétés en pourcentage.

Tableau 3: Cycle d'amplification obtenu en Q-PCR pour le gène ACS pour la Cavendish (a.) au jour 1 et pour le gène ACO pour Pl au jour 2 (b.).

Sommaire

Introduction.....	1
1. Origine du bananier et commercialisation de la banane :	1
2. Diversité génétique :	1
3. Description botanique :.....	3
4. L'inflorescence :.....	4
5. Le fruit :	5
5.1 Le développement du fruit :.....	5
5.2 La température.....	6
5.3 Physiologie du fruit :.....	6
6. La maturation du fruit :	7
6.1 Les changements texturaux et biochimiques du fruit climatérique au cours de la maturation:.....	8
6.2 Les principaux facteurs influençant le processus de maturation des fruits du bananier :	8
Présentation du laboratoire et du sujet de stage	13
Matériel et Méthodes	14
1. Variétés utilisées :	14
2. Echantillonnage :	14
3. Extraction d'ARN :	14
4. Traitement DNase :	16
5. Réverse transcription :	16
6. Polymérisation en chaine (PCR):	16
6.1 PCR de vérification du traitement DNase :.....	16
6.2 PCR de vérification de la RT :.....	17
6.3 PCR Quantitative :	17
6.4 Analyse de l'efficacité des amorces :.....	17
7. Analyse des échantillons :	18
7.1 Mesure de l'acidité du fruit et de la teneur en composé en matière sèche soluble (BRIX) :..	18
7.2 Mesure de l'acidité titrable du fruit	18
7.3 Analyse quantitative de l'extraction d'ARN :	18
7.4 Analyse qualitative de l'extraction d'ARN :.....	19
7.5 Analyse des résultats Q-PCR pour le calcul de l'efficacité des amorces :	19
7. 6 Analyse des résultats Q-PCR pour l'étude d'expression :.....	19

8. Séquence des amorces utilisées :.....	20
Résultats	22
1. Analyse biochimique :	22
1.1 Evolution du BRIX :	22
1.2 Evolution de l'acidité titrable:	22
2. Analyse moléculaire :	23
2.1 Extraction d'ARN :.....	23
2.2 Analyse quantitative de l'extraction d'ARN :	23
2.3 Analyse qualitative de l'extraction d'ARN :	23
2.4 Vérification du Traitement DNase :.....	24
2.5 Obtention de d'ADN complémentaire :	24
2.6 Mise au point des conditions PCR compatibles à l'ensemble des gènes utilisés :	25
2.7 Analyse de l'expression en Q-PCR :	25
2.8 Validation des conditions PCR classique en Q-PCR	26
2.9 Etude de l'efficacité des amorces pour les différentes variétés :	26
2.10 Analyse transcriptionnelle :	27
Discussion	28
Perspective	30

Introduction

1. Origine du bananier et commercialisation de la banane :

Le bananier est originaire de l'Asie du Sud-est, où il est retrouvé de l'Inde à la Polynésie (Simmonds, 1963), son centre de diversification semble être la Malaisie ou l'Indonésie (Daniells *et al.*, 2001). Les bananes ont été l'une des premières plantes cultivées il y a environ 10 000 ans. Sa propagation a eu lieu vers l'Afrique de l'Ouest il y a au moins 2500 ans (Mbida Mindzie *et al.*, 2001). Son implantation aux Amériques s'est d'abord faite par la République Dominicaine, en 1516 grâce à des plants en provenance des îles Canaries, et s'est poursuivie vers l'Amérique Centrale et du Sud. Ainsi, depuis des millénaires, les migrations humaines et les échanges de matériel végétal ont introduit le bananier dans des situations écologiques très différentes sur tous les continents (Lassoudière, 2007).

Les bananes représentent la source d'énergie alimentaire la plus importante dans le Pacifique (Daniells *et al.*, 2001). La culture de la banane occupe le 4ème rang mondial des denrées alimentaires les plus importantes après le riz, le blé et le lait (INIBAP, 2010 ; FAO, 2010). Ainsi, cette culture joue un rôle socio-économique important pour les pays en développement des zones tropicales et subtropicales, notamment en Afrique de l'Est, du Centre et de l'Ouest, du Sud-Est Asiatique, de l'Amérique Centrale et du Sud et des Caraïbes (Frison *et al.*, 1998). Les bananes et plantains représentent la plus grande récolte de fruits en termes de production et de commerce mondial à la fois. En 2010, la production mondiale totale était de 102 millions de tonnes (FAO, 2010), dont environ 15% sont destinés à l'exportation, le reste étant consacré à la consommation locale ou à la transformation industrielle (ODEADOM, 2010).

La culture bananière est la principale activité agricole en Martinique et en Guadeloupe, elle occupe respectivement 6398 et 2453 ha (FOA, 2010). La production bananière représente environ 20% d'exportation (ODEADOM, 2010). La Guadeloupe et la Martinique ont un taux de chômage parmi les plus élevés en Europe. C'est pourquoi la filière banane est importante en termes d'emploi, 40% des salariés agricoles en Guadeloupe et 60% des salariés agricoles en Martinique (UGPBAN, 2012).

2. Diversité génétique :

Les bananiers appartiennent à l'ordre des Scitaminales. C'est une monocotylédone à fleurs asymétriques zygomorphes. Ils forment la famille des Musaceae : cotylédon unique, les pièces florales sont au nombre de 3 ou multiple de 3, nervure secondaire parallèle l'une part rapport

Tableau 1 : Classification et répartition géographique des principaux bananier cultivés (Bakry *et al*, 1997).

Sous groupe	Cultivars	Type de fruit	Distribution
Groupe AA			
Sucrier	Pisang Mas, Fayssinette, Figue sucrée	dessert sucré	Tous continents
Psang Lilin	-	dessert	Indonésie, Malaisie
Pisang Berangan	-	dessert	Indonésie, Malaisie
Lakatan	-	dessert	Philippines
Groupe AAA			
Cavendish	Lacatan, Poyo, Williams, Grande Naine, Petite Naine	dessert	Pays exportateurs
Gros Michel	Gros Michel, Highgate, Cocos	dessert	Tous continents Philippines
Figue Rose	Figue Rose rose, Figue Rose verte	dessert	Pacifique, Antilles, Afrique de l'Est
Lujugira	Intuntu, Mujuba	à bière, à cuire	Indonésie, Afrique
Ibota	Yangambi km5	dessert	
Groupe AB			
Ney Poovan	Sait Velchi, Sukari	dessert acide	Inde, Afrique de l'Est
Groupe AAB			
Figue Pomme	Maça, Silk	dessert acide	Tous continents
Pome	Prata	dessert acide	Inde, Malaisie, Australie, Brésil, Afrique de l'Ouest
Mysore	Pisang Ceylan	dessert acide	Inde
Pisang Kelat	Pisang Kelat	dessert	Inde, Malaisie
Pisang Rajah	Pisang Rajah Bulu	à cuire	Malaisie, Indonésie
Plantains	French corne, Faux corne	à cuire	Afrique du Centre et de l'Ouest, Caraïbe, Amérique latine
Popoulou	Popoulou	à cuire	Pacifique
Laknao	Laknao	à cuire	Philippines
Pisang Nangka	Pisang Nangka	à cuire	Malaisie
Groupe ABB			
Bluggoe	Bluggoe, Matavia, Poteau, Cacambou	à cuire	Philippines, Caraïbe, Amérique latine
Pelipita	Pelipita	à cuire	Philippines, Amérique latine
Pisang Awak	Fougamou	dessert	Thaïlande, Inde, Philippines, Afrique de l'Est
Peyan	-	à cuire	Philippines, Thaïlande
Saba	Saba	à cuire	Philippines, Indonésie, Malaisie

à l'autre, une absence de formations vasculaires secondaires dans la tige et les racines. On distingue ainsi trois genres :

- Le genre *Musella*, très peu présent, est localisé en Asie.
- Le genre *Ensete* qui ne comporte pas d'espèce parthénocarpique et ne se multiplie que par graines. Espèces sauvages localisées en Afrique et en Asie.
- Le genre *Musa* se caractérise par des inflorescences avec des bractées insérées séparément des fleurs, à l'inverse du genre *Ensete*. Le genre *Musa* présente une forte variabilité.

La combinaison entre l'évolution naturelle et la sélection faite par l'homme est à l'origine de l'agriculture qui a établi la diversité génétique actuelle. De ce fait, les bananiers à fruits charnus ont été valorisés pour pouvoir être commercialisés. Les espèces les plus cultivées sont triploïdes ($2n=3x=33$). On distingue ainsi la Cavendish qui représente plus de 30 cultivars et les plantains qui représentent plus de 150 cultivars (Lassoudière, 2007).

La grande majorité des bananiers cultivés sont dérivés de croisements inter et intra-spécifique entre deux diploïdes sauvages ($2n=2x=22$), *Musa acuminata* et *Musa balbisiana* (Simmonds et Shepherd, 1955 ; Pollefeys *et al.*, 2004). Ces deux parents ont le génome AA (*Musa acuminata*) ou BB (*Musa balbisiana*). Ces deux espèces diploïdes *Musa* ont un fruit avec peu d'amidon et seulement une petite quantité de chair car possèdent des graines, et n'ont donc aucune valeur d'un point de vue culture (Heslop-Harrison et Schwarzacher, 2007).

La plupart des bananiers domestiqués sont triploïdes, avec AAA (principalement, les bananes desserts), AAB ou ABB (principalement mais pas exclusivement les plantains, féculents consommés après cuisson).

Les bananiers sont classés en 3 groupes :

- le groupe diploïde AA, figue sucrée ; feuillage érigé, doigts petits, peau mince, pulpe très sucrée.
- le groupe diploïde AB, Safet Velchi ; grande taille, fruits à peau plus épaisse, sucrés acides.
- le groupe triploïde AAA, ce groupe comprend la quasi-totalité des cultivars destinés à l'exportation. Figue rose ; fruits épais et peu courbés, péricarpe rosé, pulpe blanche plutôt farineuse. Gros Michel ; fruit grêles, courbés à apex en goulot de bouteille.

Les principaux cultivars à fruits comestibles sont indiqués dans le tableau 1.

3. Description botanique :

Le bananier est une plante vivace. C'est une tige géante, non lignifiée, qui pousse généralement de 2 à 9 m de hauteur. La tige géante est appelée pseudo-tronc et est formée par la superposition des gaines foliaires et de la hampe florale en phase de reproduction (Lassoudière, 2007). Le pseudo-tronc assure le soutien, le stockage et la conduction de l'eau (90% du bananier), des éléments minéraux et métabolites. Il prend en charge habituellement un couvert de 10-15 grandes feuilles qui sont séparées par de très courts entrenœuds. Cependant, le nombre de feuille varie selon le cultivar et les conditions environnementales (Jones, 2000). Leur durée de vie est comprise entre 70 et 200 jours et les feuilles peuvent atteindre 2m². Cette envergure joue un rôle important dans la floraison et permet de canaliser les eaux de pluie (Stover *et al.*, 1987). En général, pour un développement correct du fruit il faut minimum 8 feuilles fonctionnelles à la floraison et au moins 4 à la récolte (Lassois *et al.*, 2009).

Le limbe de la dernière feuille émise est enroulé autour de la nervure principale centrale en « cigare » et se déroule ensuite pour constituer le bouquet foliaire. Ainsi, les feuilles sont de plus en plus jeunes en se rapprochant du sommet. Des bourgeons axillaires sont observés à partir de la douzième feuille en position décalée de 180° par rapport à l'insertion de la feuille sur l'axe végétatif. Ceci est dû à la croissance très réduite des entrenœuds et à la forte dominance apicale exercée par le méristème terminal (Lassoudière, 1979). Certains de ces bourgeons, situés à l'aisselle de chaque feuille, (3 ou 4 seulement) ont la capacité de s'enraciner et de se développer en rejets.

La tige souterraine ou le bulbe donne les racines, les feuilles et permet l'inflorescence. C'est de ce bulbe que se différencient les rejets assurant, par multiplication végétative, la pérennité de l'espèce. Le nombre de rejet et leur vigueur varie en fonction des génotypes et des conditions de culture.

A la fin de la phase végétative, le changement de fonctionnement du méristème central provoque la croissance et l'allongement de la tige vraie au cœur du pseudo-tronc. La vraie tige est composée de deux régions ; le cylindre central et le cortex, reliés entre eux par le péricycle. C'est à partir du cylindre central que des racines ramifiées sont émises. La fin de la phase végétative provoque aussi l'émergence de l'inflorescence.

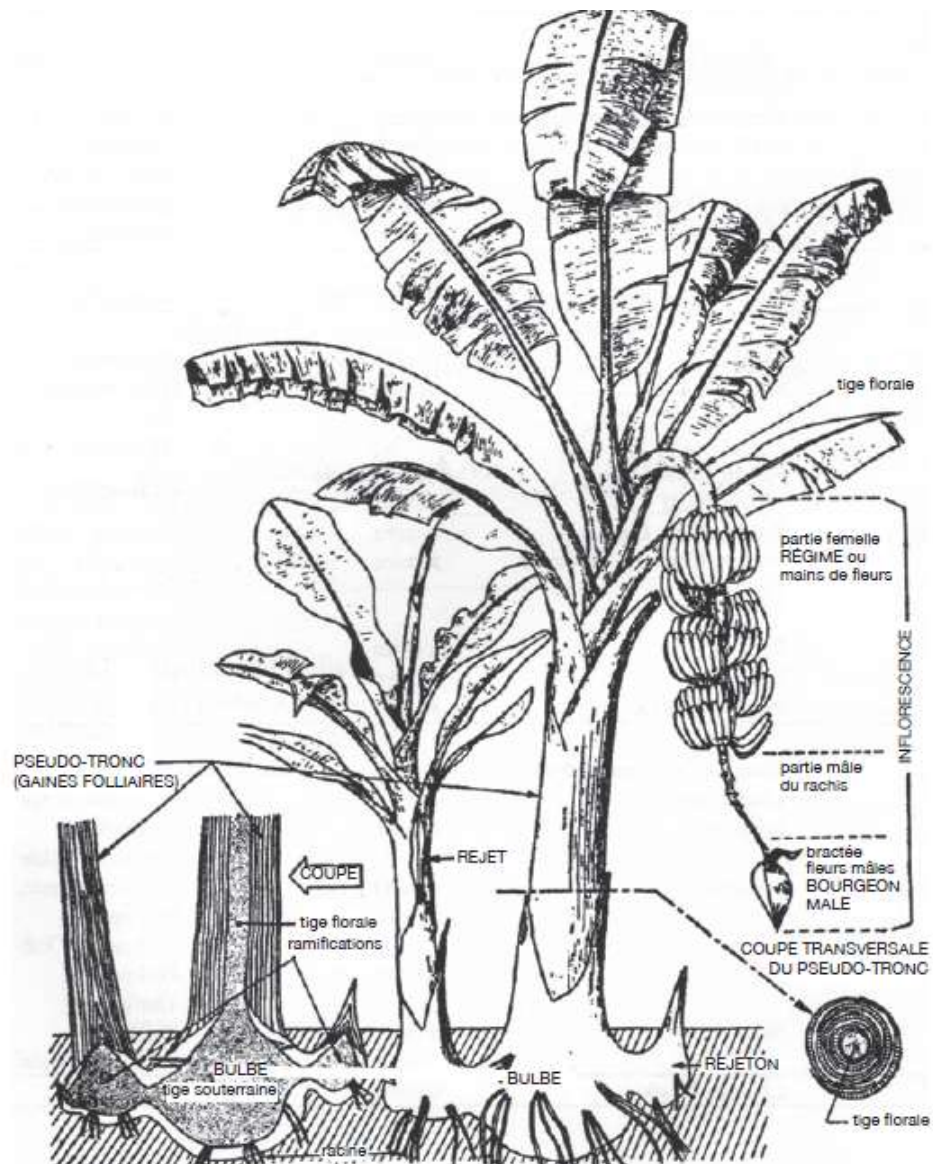


Figure 1 : Représentation de l'organisation du bananier (Champion, 1963).

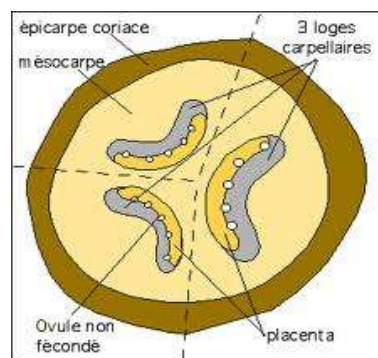


Figure 2 : Dessin d'une coupe transversale d'un ovaire de bananier
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/banane.htm>.

4. L'inflorescence :

L'inflorescence peut survenir à n'importe quel moment de l'année, en fonction de la maturité des plantes. L'inflorescence est très variable d'un bananier à l'autre. Elle se forme à l'extrémité de la tige et traverse tout le faux tronc, poussée par la hampe florale (Lassoudière, 2007). L'inflorescence du bananier, appelée régime, se caractérise par un pédoncule robuste d'environ un mètre recourbé vers le bas (figure 1). L'inflorescence du bananier est un épi de cymes inséré de façon hélicoïdale le long d'un axe, le rachis. Chaque cyme est constituée d'une bractée (ou spathe). La bractée est déhiscente, imbriquée, disposée selon trois hélices qui se soulèvent avant de tomber rapidement. A l'aisselle de chaque bractée, les fleurs sont insérées en double rangée. Chaque double rangée de fleur constitue un « étage florifère », appelée « main ». Ce sont les mains qui forment les régimes de fruits et sont composée de 10 à 30 fleurs ou doigts insérés selon deux rangées. Le régime constitue l'ensemble des fruits qui sont issus du développement des ovaires des fleurs femelles. Pour avoir un régime mature, il faut compter 2 à 6 mois après l'inflorescence. Les doigts sont dirigés vers le bas et se redressent progressivement pour atteindre en plus ou moins 15 jours, le stade appelé « stade doigts horizontaux ». Le nombre de « mains » et de « doigts » par régime varie selon les variétés et les conditions de culture.

Les fleurs différenciées par les méristèmes floraux sur les premières rangées/premières bractées sont des fleurs femelles. Ces fleurs femelles possèdent un ovaire infère comprenant trois loges carpellaires à l'intérieur desquelles deux rangées d'ovules sont insérées sur un placenta axillaire et des étamines non fonctionnelles (figure 2). Les ovaires se remplissent de pulpe pour former le fruit sans pollinisation ni formation de graines. C'est ce qu'on appelle la reproduction parthénocarpique, autrement dit, ils se développent sans le stimulus de la pollinisation. Ils sont aussi stériles et ne contiennent que rarement des graines. Les fruits peuvent être au nombre de 300 et sont habituellement de 15-30 cm de longueur et 50-300 g en poids.

Après les fleurs femelles, apparaissent deux à trois mains de fleurs hermaphrodites avec toutes les pièces florales avortées, suivies par les mains de fleurs mâles constituées d'ovaires réduits et d'étamines bien développées. Les fleurs mâles tombent au fur et à mesure, dénudant ainsi la partie inférieure de la hampe. La croissance de l'inflorescence se poursuit indéfiniment pour former le bourgeon mâle, constitué de la superposition des bractées. S'il

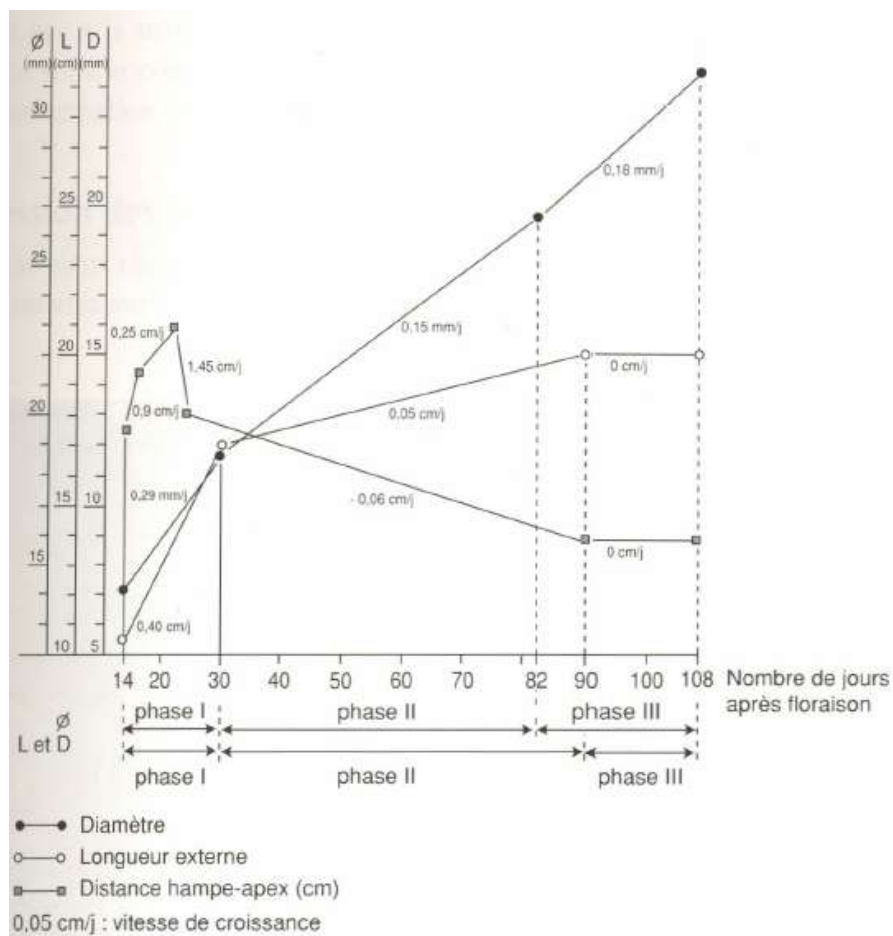


Figure 3: Schéma des phases de croissance du fruit (Lassoudière, 2007).

n'est pas coupé, ce bourgeon mâle prolongera sa croissance jusqu'à la maturité des fruits et la fanaison de la tige (Lassois et *al.*, 2009).

5. Le fruit :

5.1 Le développement du fruit :

Les bananes se développent de manière parthénocarpique à partir des fleurs femelles et sont formées de la peau (le péricarpe) et de la pulpe (endocarpe). Le doigt est relié au coussinet par un pédicelle. Le péricarpe est composé d'un épiderme stomatifère avec une cuticule ne permettant que peu d'échanges gazeux, d'une couche parenchymatique sous-épidermique et d'une zone profonde à parenchyme lâche (Omoaka, 2000). La couche parenchymatique sous-épidermique contient des chloroplastes. Les fruits possèdent une grande proportion de peau qui diminue avec leur maturité. Les ovules avortés se retrouvent dans l'endocarpe et les grosses cellules ovoïdes amylières des 3 carpelles constituent l'essentiel de la pulpe (Lassoudière, 2007).

Chez la variété Cavendish, quatre périodes essentielles distinguent la croissance du fruit (Lassoudière, 2007) (figure 3):

- La croissance faible jusqu'au début de l'allongement de la hampe florale ;
- Les divisions cellulaires très actives de 10 jours avant à 30 jours après la sortie de l'inflorescence à l'extérieur. Les divisions cellulaires sont à l'origine du développement de la pulpe et correspondent à une phase de forte élongation du fruit et de faible augmentation du poids sec de la pulpe ;
- L'accroissement cellulaire de 30 à 80 jours après la sortie de l'inflorescence à l'extérieur. Cette période correspond au remplissage des cellules de la pulpe par accumulation d'amidon qui est la forme principale de stockage. Les assimilats sont amenés jusqu'aux fruits par le pédoncule dont le rôle est uniquement conducteur ;
- La phase finale de maturation marquée entre autre par l'hydrolyse de l'amidon. Elle commence avant la récolte et avant le remplissage maximal du fruit.

Au sein d'un même régime, des différences de développement entre les fruits sont observées. Les fruits initiés les premiers sont par exemple de 30 à 40% plus gros que ceux initiés les derniers (Robinson, 1996). Les écarts de longueur entre la deuxième et la dernière main s'accroissent du début du relèvement des doigts jusqu'à la récolte mais la valeur relative reste constante (20%) (Lassoudière, 2007). Il a été suggéré que le développement différentiel des fruits résulterait des différences au niveau des divisions cellulaires et des caractéristiques de remplissage des fruits causées par la différence d'âge observée entre les fruits. Lassoudière

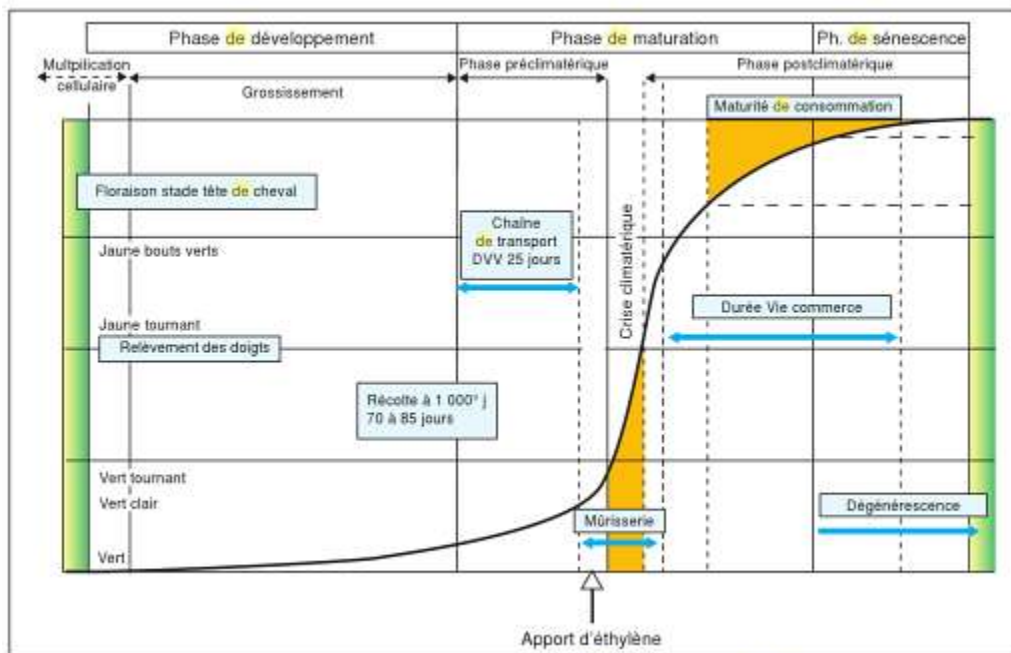


Figure 4: Schéma des phases du développement et de la maturation de la banane caractérisées par l'évolution de la couleur de la peau (courbe en gras noir). En abscisse, temps en jours et en ordonnées stade de l'échelle colorimétrique (Lassoudière, 2007).

(2007) précise que si la différence d'âge entre les fleurs d'une même main n'est que de deux jours en moyenne, elle est de plus de 15 jours entre les mains 1 et 8. Jullien *et al.* (2001) ont estimé que la différence entre les premières et dernières mains était de 70 degrés jour.

5.2 La température

La température est un facteur important dans le processus de développement du fruit. En effet, la température optimale est mesurée afin de récolter des fruits de bonne qualité. Ceci permet de traduire l'âge des fruits en se basant sur le degré jour. Cette température correspond à la somme thermique journalière qui est définie à partir d'un seuil de 14 °C qui représente la température minimale permettant la croissance du bananier. Le Degré Jour est une valeur représentative de l'écart entre la température d'une journée donnée et un seuil de température préétabli. Cette somme de température journalière est égale à $[(T^{\circ} \text{maxi}) + (T^{\circ} \text{mini})/2] - 14$ (météo France). Ainsi, il y aura une croissance du fruit caractéristique si le résultat de cette formule n'est pas égal à zéro. Cette température correspond à la durée de vie verte (DVV) entre le temps de la coupe des fruits et le début de leur crise climatérique. Le degré jour permet de déterminer avec précision la date de récolte optimale (Jullien *et al.*, 2008). Les degrés-jours sont largement utilisés dans la physiologie des cultures afin de prévoir la durée des phases de développement de la plante (Bonhomme, 2000). La maturité commerciale est atteinte chez la banane lorsque le fruit a cumulé 900°C jour (DJ) au seuil 14°C depuis le marquage du stade doigt horizontal. Le degré jour est un indicateur fiable pour estimer la croissance (Jullien *et al.*, 2008).

5.3 Physiologie du fruit :

On distingue deux types de fruit : les fruits climatériques comme la banane, la pomme et l'avocat et les fruits non climatériques comme la fraise, le raisin et l'ananas.

Le processus de maturation des fruits climactériques se caractérise par une forte activité respiratoire (appelée crise respiratoire) et par une production autocatalytique d'éthylène. La période post-récolte des bananes d'exportation comprend trois étapes principales: d'abord, la phase pré-climactérique au cours de laquelle le fruit reste immature ; puis, la phase de maturation accompagnée d'une activité respiratoire intense et enfin, la phase de sénescence du fruit (John et Marchal, 1995) (figure 4).

La phase pré-climactérique, aussi appelée durée de vie verte, est particulièrement importante pour les exportateurs qui recherchent une durée de vie verte la plus longue possible compatibles aux durées de transport généralement longue compte tenu de l'éloignement

entre les zones de production et de commercialisation. Durant cette période, les fruits verts matures présentent une faible activité catabolique et métabolique. Le taux de respiration est faible et la production d'éthylène presque indétectable (Marriott et Lancaster, 1983). La durée de vie verte peut être allongée en modifiant certains paramètres environnementaux de stockage tels que la température, l'humidité relative et le rapport CO₂/O₂.

La période climactérique se caractérise par 3 principaux processus (Seymour *et al.*, 1993) :

- D'une part, une augmentation de la respiration du fruit marquée par une augmentation de la production de CO₂.
- D'autre part, une diminution du niveau d'oxygène dans la pulpe et finalement une augmentation rapide et transitoire de la production d'éthylène par la pulpe. Ce pic climactérique peut se produire sur le plant mais dans le cas des bananes d'exportation, celui-ci est induit après la récolte par un apport exogène d'éthylène avant la production naturelle. L'éthylène est physiologiquement actif à faible dose (Peacock, 1972).
- Et, la dernière phase du développement post-récolte des bananes est la phase de sénescence qui se caractérise par une importante perte de fermeté du fruit.

La maturation des bananes se caractérise par de nombreuses modifications de la pulpe et de la peau permettant l'obtention d'un fruit comestible. Ainsi se distinguent des modifications d'ordre physico-chimiques (caractéristiques organoleptiques, couleur, ramollissement), des modifications biochimiques (dégradation des chlorophylles et synthèse de nouveaux pigments, hydrolyse d'amidon, émission de composés volatils, solubilisation des polysaccharides pariétaux, accumulation du saccharose et acides organiques) et des modifications moléculaires (variation dans l'expression des gènes au niveau transcriptomique, protéomique et/ou enzymologique).

6. La maturation du fruit :

La maturation du fruit est un processus complexe caractérisée par des changements drastiques entre autre la dégradation de l'amidon en sucres solubles (saccharose, glucose et fructose) dont le rapport aux acides organiques impacte la saveur, la synthèse des composés volatiles à l'origine de l'arôme du fruit, les modifications des parois (dégradation et remaniement) contribuant à la perte de fermeté du fruit (Happi Emaga *et al.*, 2008). La maturation est un phénomène irréversible, coordonné, génétiquement programmé. L'éthylène y joue un rôle important en initiant et contrôlant aux niveaux moléculaire et biochimique les modifications associées à la maturation pour les fruits climactériques.

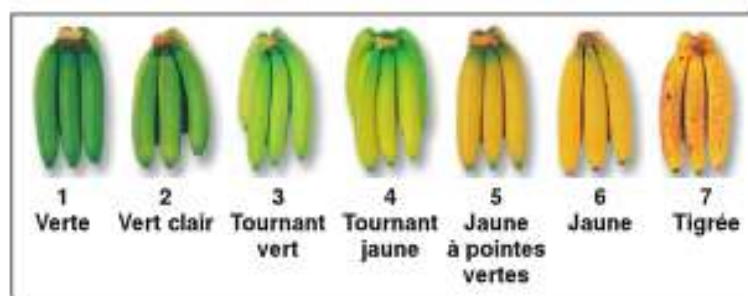


Figure 5: Stade de maturation des fruits du bananier (Lassoudière, 2007).

6.1 Les changements texturaux et biochimiques du fruit climatérique au cours de la maturation :

De façon générale, la maturation des fruits correspond à un ensemble de changements biochimiques et physiologiques conduisant à l'état de maturité et conférant au fruit ses caractéristiques organoleptiques (Brady, 1987). Elle peut être influencée par les facteurs environnementaux. Après l'état de maturité, le fruit entre dans une période de sénescence conduisant à la désorganisation cellulaire et à la mort. Les changements biochimiques sont nombreux : accroissement intense de la production d'éthylène, de la respiration et de l'émission de composés organiques volatils, hydrolyse de l'amidon et diminution des acides organiques, synthèse des pigments, régression de la chlorophylle et solubilisation des composés pectiques (Grierson *et al.*, 1981 ; Selvaraj *et al.*, 1989 ; Lizada, 1993). Ces changements biochimiques subits par le fruit sont perceptibles au niveau cellulaire. Il s'agit des modifications des membranes qui aboutissent à une augmentation de la perméabilité, à une fuite accrue de solutés et à la décompartmentation cellulaire (Tucker *et al.*, 1987 ; Redgwell *et al.*, 1997). Au cours de la maturation et de la sénescence, ces membranes deviennent perméables aux ions et aux molécules organiques (Tucker *et al.*, 1987).

Les fruits destinés à la consommation sont récoltés à une maturité physiologique optimale, c'est-à-dire, à partir du stade où le fruit possède la capacité de réponse à l'éthylène et de synthétiser celui-ci de façon autocatalytique. Les stades de maturation des bananes et des plantains couramment comestibles sont déterminés à partir de différentes caractéristiques du fruit : la couleur de la peau et de la pulpe, la fermeté de la pulpe, l'extrait sec soluble, le taux d'humidité et la teneur en matière sèche. On distingue ainsi sept stades de maturation qui se caractérise visuellement (Li *et al.*, 1997) (figure 5).

6.2 Les principaux facteurs influençant le processus de maturation des fruits du bananier :

L'éthylène, l'amidon, les pectines, les acides aminés et les acides organiques sont les principales facteurs qui influencent le processus de maturation des fruits du bananier (Happi Emaga *et al.*, 2008).

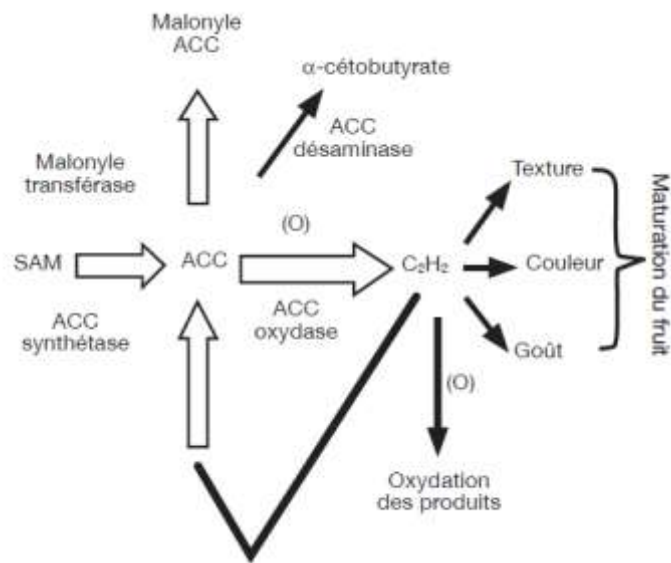


Figure 6: Voies de la biosynthèse et du métabolisme de l'éthylène (Prasanna et al., 2007).

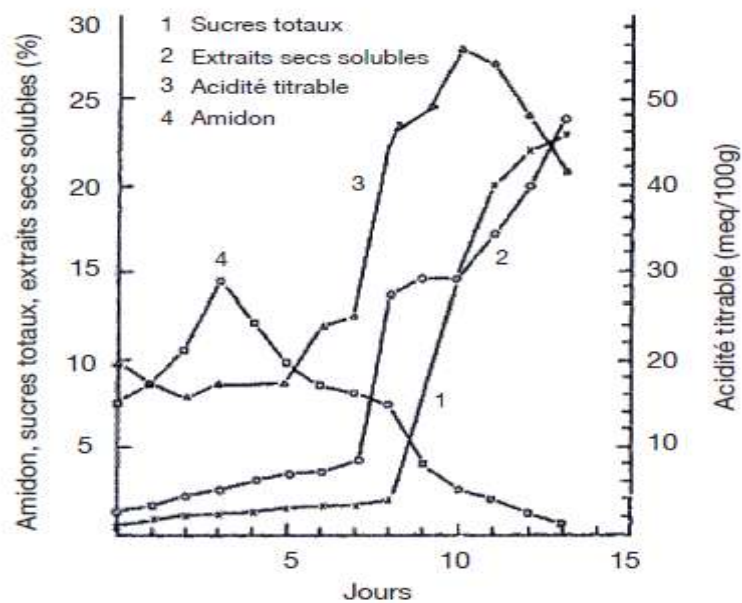


Figure 7: Evolution de l'amidon, des sucres totaux, des extraits secs solubles et de l'acidité titrable dans la pulpe de la banane au cours de la maturation (Madamba et al., 1977).

6.2.1 L'Éthylène :

L'Éthylène gouverne de nombreux aspects du cycle végétal, tel que la germination des graines, l'initiation des racines, le développement des fleurs, la maturation des fruits, la sénescence, et les réponses aux stress biotiques et abiotiques. Les différentes étapes de la biosynthèse de l'éthylène chez les plantes supérieures dont la banane sont aujourd'hui connues (Yang *et al.*, 1984 ; Kende, 1993). Deux enzymes majeure interviennent dans la chaîne de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes: l'ACC (Acide 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylique) synthétase (ACS) et l'ACC oxydase (ACO).

L'éthylène est synthétisé à partir de la méthionine en trois étapes: (i) conversion de la méthionine en S-adenosyl-L-méthionine (SAM) catalysée par l'enzyme SAM synthase, (ii) la formation d'une aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) sous l'action de l'ACS, et (iii) conversion de l'ACC à l'éthylène, qui est catalysée par l'ACO (figure 6).

6.2.2 L'amidon :

L'amidon est le composant le plus important et le plus abondant de la pulpe des fruits du bananier à l'état vert mature. En effet, la teneur en amidon varie entre 70% et 80% dans la phase pré-climatérique et diminue à moins de 1% à la fin de la phase climatérique (Madamba *et al.*, 1977). La dégradation de l'amidon influence le ramollissement du fruit (Grierson *et al.*, 1981 ; Brady, 1987). Son hydrolyse enzymatique, effectuée par les amylases, entraîne une modification de la structure cellulaire. Au cours de la maturation de la banane, les teneurs en amidon, en sucres réducteurs et en saccharose changent du stade 1 de maturation (61,7 % ; 0,2 % et 1,2 %, respectivement) au stade 9 de maturation (2,6 % ; 33,6 % et 53,2 % respectivement) (Lii *et al.*, 1982) (figure 7).

Ainsi, l'amidon se dégrade alors que la teneur en glucose et en fructose augmente au cours de la maturation.

6.2.3 Les pectines :

Le changement textural est l'événement majeur dans le ramollissement du fruit. Il est le résultat de la dégradation enzymatique ou non de la structure des polysaccharides de parietaux (Grierson *et al.*, 1981 ; Bartley *et al.*, 1982 ; Tucker *et al.*, 1987). La texture du fruit est influencée par plusieurs facteurs tels que l'intégrité structurale de la paroi cellulaire, l'accumulation des polysaccharides de stockage et la pression produite dans les cellules par effet osmotique (Jackman *et al.*, 1995). Les pectines, la cellulose et les hémicelluloses

constituent les classes majeures des polysaccharides de la paroi cellulaire qui subissent des modifications lors de la maturation. Lors de la maturation, la perte progressive en rigidité est le résultat de la solubilisation progressive des protopectines dans la paroi cellulaire pour former la pectine et d'autres produits (Grierson *et al.*, 1981 ; John *et al.*, 1986 ; Sakai *et al.*, 1993).

Toutes les modifications constatées au cours de la maturation et du vieillissement font que les pectines extraites des fruits mûrs ont un faible degré d'estérification, un faible poids moléculaire et une teneur en sucre élevée comparativement aux pectines extraites des fruits non mûrs (Huber *et al.*, 1986).

6.2.4 Les acides aminés :

Les acides aminés sont responsables de la production des composés volatiles. Les composés volatiles émis lorsque la banane est mûre sont ; les esters, les alcools, les cétones, les aldéhydes et les phénols esters. Les esters représentent 70% des composés volatiles (Tress et Drawert, 1973 ; Marcku et Jennings, 1987). La production d'un grand nombre de composés volatiles augmente au cours de la maturation jusqu'à ce que la peau brunisse, à ce stade la production stagne ou diminue (Tress et Jennings, 1972 ; Marcku et Jennings, 1987). L'aspartate et l'alanine permettraient à la banane d'entrer en phase climatérique (Seymour *et al.*, 1993). Ces deux protéines seraient produites respectivement par le glutamate oxaloacetate transaminase et le glutamate pyruvate decarboxylase. L'aspartate et l'alanine seraient constants au cours de la maturation de la banane (Wade *et al.*, 1978). La leucine et la valine, elles subissent une forte augmentation au cours de la maturation et sont responsables de la production des composés volatiles (Seymour *et al.*, 1993).

6.2.5 Les acides organiques :

La présence d'acide organique affecte le goût de la banane. Le niveau des acides organiques est extrêmement variable en fonction des espèces, des stades de développement et du type de tissus. Dans la pulpe de la banane, l'acidité augmente au cours de la maturation par l'accumulation de l'acide malique, citrique et oxalique (Palmer, 1971 ; Mariott 1980). L'acidité joue un rôle important dans la qualité des fruits. En effet, un fruit trop acide ne peut pas être commercialisé. Le citrate commence à s'accumuler au cours de la deuxième phase de développement du fruit, lorsque les cellules subissent un élargissement rapide (Erickson, 1968). Le citrate s'accumule jusqu'à atteindre 50% de la taille du fruit puis diminue progressivement au fur à mesure que le fruit mûrit (Sinclair, 1984 ; Shimada *et al.*, 2006). La

synthèse du citrate commence par la condensation de deux atomes de carbone, l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate, en quatre pour donner six carbones de citrate. Cette réaction est catalysée par la citrate synthase dans les mitochondrie (Sadka *et al.*, 2001). Le citrate est converti en isocitrate par l'aconitase (Wallace, 1971). Le goût de l'astringence serait dû à l'acide oxalique qui subit une décarboxylation par l'oxydase oxalate pendant la maturation (Shimokawa *et al.*, 1972 ; Ueda and Ogata, 1976). Le malate est l'enzyme qui catalyse l'accumulation de la synthèse du malate. Chez de nombreux fruits, le malate est l'un des acides les plus répandues, et est un acteur important dans de nombreuses fonctions cellulaires. Dans la banane le citrate et le malate sont prédominant dans le fruit vert (John et Marchal, 1995).

6.2.5.1 Le malate :

Le malate joue différent rôle dans la plante tel que ; le contrôle de l'ouverture de stomates, l'amélioration de la nutrition, augmente la résistance aux métaux lourds, fasse a l'aluminium et au nitrogène, et d'autre processus liés a des voies métaboliques chez les C4 et CAM (Ferne et Martinoia, 2009). Cependant l'accumulation du malate varie selon l'espèce et sur les mêmes cultivars. Chez la banane, le malate s'accumule tout au long de la maturation et pendant la phase climatérique (Agravante *et al.*, 1991). Le niveau du malate semble être affecté lorsque la plantes est exposée aux changements de l'environnement (Lakso et Kliewer, 1978). La malate synthase est responsable de la synthèse de l'acide malique dans le cycle glyoxylate. Elle permet de convertir les lipides en hydrate de carbones. Cette réaction catabolique se fait dans le peroxysome via l'acetyl-CoA (figure 8). Des études ont montré que le malate synthase (MS) pourrait être présent sous plusieurs formes dans le génome de la banane. D'autre part, la MS s'exprimera spécifiquement dans les tissus impliqués dans la maturation. Le gène de la malate synthase coderai pour 556 acides aminés pendant la maturation de la banane (Pua *et al.*, 2003). Il a été remarqué aussi qu'il y avait une différence d'expression selon les stades de récolte des fruits (Pua *et al.*, 2003). De plus l'expression de la MS est régulée par l'éthylène (Sweetmann *et al.*, 2009).

6.2.5.1 Aconitase :

L'aconitase est la conversion réversible du citrate en isocitrate par l'intermédiaire de l'acide *cis*-aconitique (figure 9). L'aconitase mitochondriale est impliqué dans le cycle de Krebs (Peyret *et al.*, 1995). L'activation de cette enzyme se fait par une liaison labile de fer (Rouault et Klausner, 1996). Chez les animaux et les bactéries, l'aconitase est régulé par l'homéostasie du fer et le métabolisme des acides organique. En effet, lorsque le fer est

limitant, l'aconitase perd de son activité (Hentze et Kuh, 1996). Peu d'étude on été réalisé sur l'aconitase des plantes mais un lien a été établi entre le fer homéostatique et le niveau des acides organiques (Ma, 2005). La synthèse de citrate dans les racines et sa mobilisation peut être induite à la fois par le fer et le phosphate inorganique (Neumann *et al.*, 1999). Le citrate joue un rôle dans le transport de longue distance du fer dans les plantes à travers le xylème. De plus l'augmentation de la synthèse du citrate dans les cellules de transfert des racines serait corrélée avec le nombre de mitochondrie présentent dans ces cellules (Landsberg, 1986). Similaire aux racines, les feuilles déficientes en fer ont montré une augmentation des acides organiques, principalement le citrate et le malate (Clarck et Wallace, 1963). L'acidité des fruits à tendance a augmenté lorsque le fer est peu disponible dans la pulpe du fruit, en particulier le citrate (Bar Akiva, 1964, Alvarez-Fernandez *et al.*, 2003, Shlizerman *et al.*, 2007). L'augmentation de la concentration d'acides organique lors de la pénurie de fer a été expliqué par : (i) la réduction de l'activité de l'aconitase, (ii) une augmentation de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) ce qui entraine des flux de carbone organique pour la production d'acide, (iii) la fixation accrue de CO₂ à partir de bicarbonate accompagné d'une activité accrue de PEPC dans les racines (Abadia *et al.*, 2002). Des résultats ont montré qu'un traitement de fer au cours de la maturation du fruit était capable de réduire l'acidité du jus (Degu *et al.*, 2011).

D'autre part, il a été montré dans les agrumes que l'augmentation du citrate, causée par l'inhibition de l'aconitase, induirait la synthèse d'acide aminée (Degu *et al.*, 2011).

Présentation du laboratoire et du sujet de stage

Le Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) français créé en 1984 et spécialisé dans la recherche agronomique appliquée aux régions chaudes. Le Cirad a choisi le développement durable comme ligne de force de son action à travers le monde. Ses compétences relèvent des sciences du vivant, des sciences humaines et des sciences de l'ingénieur, appliquées à l'agriculture et l'alimentation, à la gestion des ressources naturelles et aux sociétés. A partir de ses directions régionales, le Cirad mène des activités de coopération avec plus de 90 pays. Il développe par ailleurs des pôles scientifiques à vocation régionale dans les Antilles françaises.

Le Cirad en Guadeloupe compte trois sites, dont celui de Neufchâteau qui héberge les équipes travaillant essentiellement sur la banane, l'ananas et les systèmes de culture. Les recherches s'articulent principalement autour de la qualité du fruit et de la physiologie de la maturation de la banane ; de l'épidémiologie et de la durabilité des résistances aux cercosporioses du bananier ; de la virologie, de la connaissance du génome du bananier et de l'amélioration génétique et création variétale.

Les travaux de recherche de l'équipe de l'UMR QUALISUD portent sur ;

- La définition des descripteurs associés aux critères de qualité pertinents du fruit,
- La connaissance de la variabilité qualitative des bananes,
- La compréhension des mécanismes physiologiques qui gouvernent l'élaboration de ces critères.

Ainsi l'objectif du stage a été dans un premier temps d'étudier les différences physico-chimique pour les différents stades de récoltes répondant différemment à la production d'éthylène (mesure de BRIX et d'acidité titrable) pour la banane Cavendish. Et dans un second temps d'examiner la dynamique d'expression des gènes codant pour le malate synthase et l'aconitase, deux enzymes potentiellement impliquées dans le métabolisme des acides organiques. Parallèlement, les teneurs en malate, citrate et oxalate ont été mesurées sur le même matériel afin de rechercher une corrélation entre l'évolution de ces teneurs et les profils d'expression de ces gènes (expérimentation menée à Montpellier).

Matériel et Méthodes

1. Variétés utilisées :

Variétés	Génotypes	Genre	Utilisation	Lieu de culture pour échantillonnage
Cavendish	AAA	<i>Musa acuminata</i>	Banane dessert	Guadeloupe
IDN 110	AA	<i>Musa acuminata</i>	Banane dessert/Parent	Martinique
Pisang Lilin	AA	<i>Musa acuminata</i>	Banane dessert/Parent	Martinique
Pisang Jary Bouaya	AA	<i>Musa acuminata</i>	Banane dessert	Martinique

2. Echantillonnage :

En ce qui concerne la Cavendish ; les fruits ont été récoltés à quatre stades de développement en vert (400DJ, 600DJ, 700DJ et 900DJ). Trois fruits issus de trois régimes différents (répétitions biologiques) sont pris pour chaque stade et stabilisés immédiatement (stade HT). Pour le reste des fruits, un traitement à l'acétylène (un analogue de l'éthylène) a été appliqué à 10000ppm/18h/20°C, conditions minimales permettant d'induire la maturation proche des conditions de maturation naturelle. Puis après gazage un échantillonnage de trois fruits par stade a été prélevé tous les jours et ce sur huit jours. Les tissus de peau et de pulpe ont été prélevés séparément, découpés en morceaux, stabilisés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

En ce qui concerne les variétés IDN110, Pisang Lilin (PL) et Pisang Jary Bouaya (PJB) ; les fruits ont été récoltés à maturité commerciale, équivalent 900DJ Cavendish. La maturation des fruits a été induite par un traitement à l'éthylène (1000ppm/24h/20°C) puis laissés à mûrir à 20°C à l'air. Un échantillon d'au moins trois fruits a été prélevé, stabilisé dans l'azote liquide puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation. Cependant, suite à des problèmes de conservation, pour certains jours il n'y avait pas l'ensemble des répétitions biologiques.

3. Extraction d'ARN :

Tampon d'extraction

Deux cent mM de sodium borate deshydraté, 1 % de sodium deoxycholate, 2% PVP 40, 30 mM EGTA, 1% SDS, 10mM DTT en poudre, 0,5 % Igépal CA-630 a été dissout à chaud

et le pH de 9,0 a été vérifié. Au besoin le pH a été ajusté avec du NaOH. Le tout a été autoclavé et conservé à 37°C.

Note : le sodium deoxycholate et l'Igéal CA-630 peuvent être remplacés par du DIECA 2%.

JOUR 1 :

Le matériel végétal a été broyé dans de l'azote liquide et 5g de poudre ont été mis dans un tube PPCO (polypropylène colpolymère). Un volume de 25mL de tampon d'extraction, préalablement chauffé à 80°C a ensuite été ajouté (permet de lyser les cellules). L'ensemble a été homogénéisé au polytron à pleine vitesse. Il a été ensuite ajouté 12,5mg de protéinase K (permet d'éliminer les protéines présentes) et l'ensemble a été mis sous agitation faible pendant 1h30 à 42°C.

Une masse 0,3g de Potassium Chloride (KCl) a été ajoutée et l'ensemble mélangé vigoureusement à la main puis incubé dans la glace pendant 1 heure. Une centrifugation a été faite pendant 20 minutes à 13000 rpm et 4°C. Le surnageant a été récupéré dans un tube PPCO de 50ml. Du lithium chloride (LiCl) 10M froid a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 2M. Un mélange vigoureux est réalisé et l'ensemble incubé une nuit à 4°C.

JOUR 2 :

Le mélange de la veille a été centrifugé à 13 000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a été éliminé par renversement du tube. Il a été ajouté 2mL de LiCl 2M froid puis le tout a été vortexé. Une centrifugation a été ensuite effectuée à 13 000 rpm pendant 5 min et à 4 °C. Le surnageant a été éliminé puis il a été ajouté 1ml d'eau DEPC. Le mélange a été vortexé et incubé 15min dans la glace (permet de dissoudre les ARN). Une centrifugation a été effectuée à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré dans un tube Eppendorf de 2ml. Il a été ajouté au surnageant 800µl de phénol/chloroforme/alcool Isoamylique (24/24/1) (permet d'éliminer les protéines restantes). Un mélange au vortex a été effectué puis une centrifugation pendant 5 min à 4°C à 13 000 rpm. Le surnageant a été récupéré, il a été ajouté 800µl de chloroforme/Alcool Isoamylique (24/1). Le mélange a été vortexé puis centrifugé 5 min à 4°C 13 000 rpm. Le surnageant a été récupéré auquel 42µl de potassium Acétate 5M pH 5,5 ont été ajoutés pour une concentration finale de 0,2M. Il a été ajouté au surnageant 2,5 volume d'éthanol pur (permet de précipiter l'ARN). L'ensemble a été homogénéisé et incubé une nuit à -20°C pour laisser précipiter.

JOUR 3 :

Le mélange de la veille a été centrifugé à 13 000 rpm pendant 45 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et 200µl d'éthanol froid à 80% a été ajouté au culot d'ARN. Le tout a été centrifugé à 13 000 rpm, 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot a été séché sous la hotte. Les ARN ont été suspendus dans 150/300µl d'eau DEPC à 4°C (volume tenant compte de la saturation).

4. Traitement DNase :

Le milieu réactionnel est constitué de 15µl d'ARN (15µg), 3µl de DNase 10U/µl (Promega, France), 2µl tampon 10X pour un volume final de 20µl.

Témoin positif : 2µl d'ADN de banane Cavendish, 2µl tampon 10X, 3µl DNase 10U/µl, 13µl d'eau distillée.

Témoin négatif: 2µl d'ADN de bananes Cavendish, 2µl tampon 10X, 16µl d'eau distillé.

L'ensemble a été incubé une nuit à 37°C.

5. Réverse transcription :

Pour un tube : 2µl ARN (2µg), 2µl amorces Random Hexamère (0,5µg/µl), 12µl H₂O. Un chauffage 5min à 70°C a été réalisé puis le mélange est ensuite incubé dans la glace. A ce mélange, sont ajoutés 5µl tampon 5X, 1,25µl dNTP (10mM chacun), 0,65µl RNasin (40U/µl), 1µl d'enzyme MMLVRT, 1,1µl d'H₂O, volume total 25µl.

L'ensemble est incubé à 37°C pendant 2 heures puis dilué au quart dans de l'eau distillée a été effectué.

6. Polymérisation en chaîne (PCR):

6.1 PCR de vérification du traitement DNase :

Mix PCR :

Pour un tube ; 1,2µl dNTP (2,5mM chaque), 2µl de tampon 10X, 0,08µl Taq eurobio (5U/µl), 0,5µl ARN (0,5µg), 0,6µl MgCl₂ (50mM), 0,1µl d'amorces Actine (0,25 µM), 15,5µl H₂O pour un volume total de 20µl.

Cycle PCR :

95°C 5min, 35 cycles de [95°C 15sec, 50°C 15sec, 72°C 30sec], 72°C 10min, 4°C.

Les analyses des résultats PCR ont été faites sur gel, d'agarose 1% et TBE 0,5X, sur lequel on dépose la totalité de l'amplification, c'est-à-dire 20µL.

6.2 PCR de vérification de la RT :

Mix PCR :

Pour un tube : 1µl ADNc (1µg), 1,2µl dNTP (2,5mM), 2µl de tampon 10X, 0,08µl Taq eurobio (5U/µl), 0,6µl MgCl₂ (50mM), 0,25µl d'amorces pour des gènes de références ; CAC (Clathrin Adaptor Complexes medium), SAMDC1(s-Adenosyl methionine decarboxylase) pour la peau et RAN (GTP-binding nuclear protein), RSP2 (Ribosomal protein S) pour la pulpe, 14,8µl H₂O pour un volume total de 20µl.

Cycle PCR :

95°C 5min, 40 cycles à [95°C 15sec, 50°C 15sec, 72°C 30sec], 72°C 10min.

Les analyses des résultats PCR ont été faites sur gel d'agarose 2% et TBE 1X.

6.3 PCR Quantitative :

Mix PCR :

Pour un tube : 5µl ADNc (5µg), 1,2µl dNTP (2,5mM), 2µl de tampon 10X, 0,08µl Taq eurobio (5U/µl), 0,6µl MgCl₂ (50mM), 0,12µl d'amorces, 2µl Syber Green pour un volume total de 20µl.

Cycle PCR :

95°C 5min, 40 cycles à [95°C 15sec, 55°C 15sec, 72°C 30sec].

6.4 Analyse de l'efficacité des amorces :

Pour chacune des 5 variétés, un pool d'ADNc a été obtenu à partir d'ARN totaux de tissus de peau et/ou de pulpe pris aléatoirement à 5 stades de maturité. Six points de dilution sérielle d'un facteur 2 ont ensuite été obtenus à partir de ce pool d'ADNc préalablement dilué au quart (voir figure ci-dessous). L'efficacité des amorces a été estimée par qPCR réalisée sur 5 µl de chacun de ces extraits d'ADNc dilué.

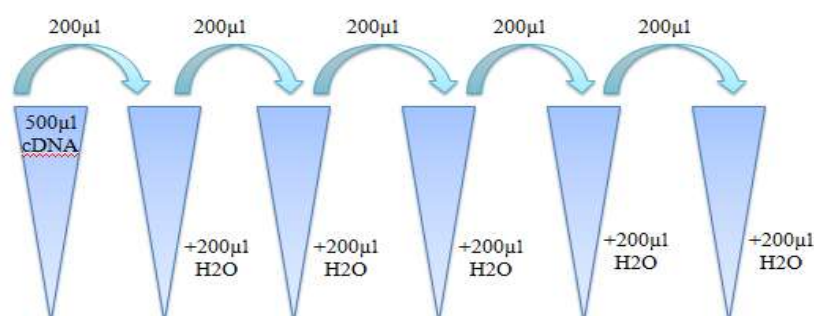


Schéma explicatif de la dilution sérielle effectuée.

7. Analyse des échantillons :

7.1 Mesure de l'acidité du fruit et de la teneur en composé en matière sèche soluble (BRIX) :

Le matériel végétal préalablement découpé et congelé a été broyé à l'aide d'un moulin à café lui aussi refroidi à l'azote liquide. Cinq gramme de poudre ont été prélevés dans un bécher auxquels ont été ajoutés 5ml d'eau distillé, l'ensemble a été mis sous agitation pendant 10min. Le mélange est transféré dans un tube Falcon de 15ml puis centrifugé 10min, 20°C à 9500 rpm. Le surnageant a été récupéré. Les mesures de BRIX et d'acidité ont été effectuées directement sur ce surnageant appelé « jus ». La mesure de BRIX a été effectuée par réfractomètre « Refracto 30 PX/GS » (Grosseron, France) sur lequel a été déposé environ 1mL de surnageant. Le BRIX a été mesuré par une méthode de réfractométrie.

7.2 Mesure de l'acidité titrable du fruit :

L'acidité du fruit a été mesurée par titrateur « TitroLine easy ». Le volume de surnageant a été complété avec de l'eau distillé qsp 50mL. Ce mélange pour atteindre sa neutralité a été complété par de l'hydroxyde de sodium à 0,1M. Le volume ajouté a été indiqué par le titrateur. Cette méthode est une analyse globale qui permet de traduire la quantité d'acide présent par neutralisation des acides présents par la base (hydroxyde de sodium).

Acquisition des données :

Le pourcentage d'acidité a été calculé à partir de la formule suivante :

$$(0,0064 * \text{Acidité titrable} * 1000) / \text{Volume titré}$$
 0,0064 étant le coefficient destiné à l'acide citrique.

7.3 Analyse quantitative de l'extraction d'ARN :

L'analyse quantitative a été réalisée au moyen d'un spectrophotomètre de type Nanodrop (Thermo Scientific, Bioblock, Ellkirch, France), ce à partir de 1.5 µl d'extrait d'ARN totaux. Le spectrophotomètre mesure les différentes DO à 230 (contaminants polysaccharide), 280 (contaminant protéique) et 260 (acide nucléique). L'appareil a été calibré pour le dosage des Acides nucléiques (ARN, ADN) et pour le calcul de leur concentration, de leur indice de pureté par rapport aux protéines (rapport $DO_{260/280}$) et polysaccharide (rapport $DO_{260/230}$).

7.4 Analyse qualitative de l'extraction d'ARN :

La qualité et la quantité des ARN totaux sont évaluées dans un premier temps par spectrophotomètre et en second temps par électrophorèse sur gel dénaturant.

Tampon de dénaturation des ARN :

1µl MOPS 10X, 0,9µL Formaldéhyde pure, 3µl Formamide, 10µg d'aliquot d'ARN dans un volume de 15µl.

L'ensemble est chauffé 15min à 65°C, puis placé dans la glace. Il a été ensuite ajouté 3µl de tampon de charge 6X.

Gel :

Pour 100ml de gel; 1g agarose, 10ml MOPS 10X, 7,1mL Formaldéhyde pure.

Tampon de migration :

Pour 500ml ; 50mL de MOPS 10X, 28,83ml de Formaldéhyde pure.

Au terme de la migration, le gel est incubé dans une solution de Bromure d'Ethidium (BET) à 3mg/ml, pendant 20min suivi d'une décoloration à l'eau distillée pendant au moins 1Heure.

7.5 Analyse des résultats Q-PCR pour le calcul de l'efficacité des amorces :

Une moyenne des cycles d'amplification des trois répétitions biologiques a été calculée. Un graphique des moyennes en fonction des logarithmes des dilutions a été ensuite construit pour obtenir la pente. L'efficacité des amorces a été calculée à partir de la formule suivante :

$(\text{PUISSANCE } (10;(-1/\text{pente}))-1)*100.$

7. 6 Analyse des résultats Q-PCR pour l'étude d'expression :

Le niveau d'expression des gènes a été calculé par la méthode de double delta (Livak et Schmittgen, 2001) basée sur une quantification relative des ARNm d'un gène donné par rapport à un gène de référence, tous les deux normalisés par un calibrateur. Les résultats sont exprimés par un rapport cible/référence de chaque échantillon normalisé par le rapport cible/référence d'un échantillon appelé calibrateur.

Pour les analyses de Q-PCR il a été fait une quantification relative. Ainsi la concentration du gène cible a été exprimée par rapport à un gène référence, obtenu à partir du même échantillon biologique.

Il a donc été utilisé la méthode du $\Delta\Delta C_t$ qui s'appuie sur les efficacités respectives des gènes de référence et cible et les C_t (Valeur à laquelle la courbe PCR croise le seuil) obtenus pour les échantillons et le calibrant. Le calibrant a été l'échantillon auquel tous les autres ont été comparés. C'était l'échantillon « non traité » ou « temps zéro ».

Le nombre de transcrit initialement présents dans le tissu analysé a été normalisé par rapport au gène de référence et relatif au calibrant. Ceci a été alors donné par la relation mathématique $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dans laquelle : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (tissu analysé) - ΔCt (calibrant) avec $\Delta Ct = Ct$ (gène cible) – Ct (gène endogène). La méthode de calcul du $\Delta\Delta Ct$ repose également sur l'hypothèse que les échantillons et le calibrant ont des efficacités d'amplification proches. Néanmoins, pour un gène donné, il existe des différences d'amplification d'un échantillon à un autre, susceptible de générer des erreurs de calcul plus ou moins importantes (Tse et Capeau, 2002).

8. Séquence des amorces utilisées :

Targets	Primer name	Sequences	Annealing T°m	Product size	Métabolismes	
Malate Synthase	MaMSI-SPF	AAAAGGCTCGAGGATCTTCAACAG	50	110	Gènes expérimentaux	
	MaMSI-SPR	AGATTGTGTATTGGGGTGACGAGCA				
Aconitase Hydratase	MaACNI-SPF	CCACGGTGGAAATTCTGCCATACGTC	50	173		
	MaACNI-SPR	AGACCGATTTCACAATTGCGTGTGCC				
ACC Oxidase	MaACO1F	AAGCTCTACGTCGGGCATAA	50	152	Biosynthèse de l'éthylène (marquers physiologiques des stades de développement)	
	MaACO1R	GACACGTTCTTAACGGGAAG				
ACC synthase	ACSI-F	AGAACTCCTCTACTTCGAT	50	215		
	ACSI-R	ATGATAGTCTCGAAGAAGTTGG				
Actine	MaActF	GAGAAGATACAGTGTCTGGA	50	231		
	MaActR	ATTACCATGCAAAATATTTAAAAG				
Clathrin adaptor complexes medium	CAC-F	CTCCATGTTCGTCCGTTATG	79.1	146		
	CAC-R	GGCTACTACTTCGGTCTTTTC				
GTP-binding nuclear protein	RAN-F	ACGGTCAAAAGCACAACACGAG	83.96	195	Gènes de référence	
	RAN-R	TCCCTGAGCAACATCAACAACACT				
Ribosomal Protein S	RPS2-F	TAGGGAATTCCGACGATTTGTTT	80.86	84		
	RPS2-R	TAGGTCATCATTTGGCTGGGA				
	RPS4-F	TGAGA GTGGCTTGACCCITGA				
	RPS4-R	GTGACATTTAGTGTCTGCTGG				
S-adenosyl methionine decarboxylase	SAMDC1-F	CCACTGGGAAAAATGAAGAAAC	81.66	172		
	SAMDC1-R	CAGACACAGCAAGCCACCTA				
MaEIL4	EIL4-3F	AGATCCAGTTCGAGTAGATTTC	50	179		
	EIL4-3R	CTACTTGGTTCATCAGTTCC				
MaCTR1	MaCTR1 SPF	TGAAACGGCTGCTGTACGTTTTGTG	50	188		
	MaCTR1 SPR	TGGATGGACCAAGGACAGAAGAAAGAGT				
MaERPS3	ERS3-ProbeU (SPF)	ATCCGTTTACCAAA GAAGTG	50	227		Récepteur à l'éthylène
	ERS2-ProbeL (SPR)	GACCAACTAATTTGAAC TCG				

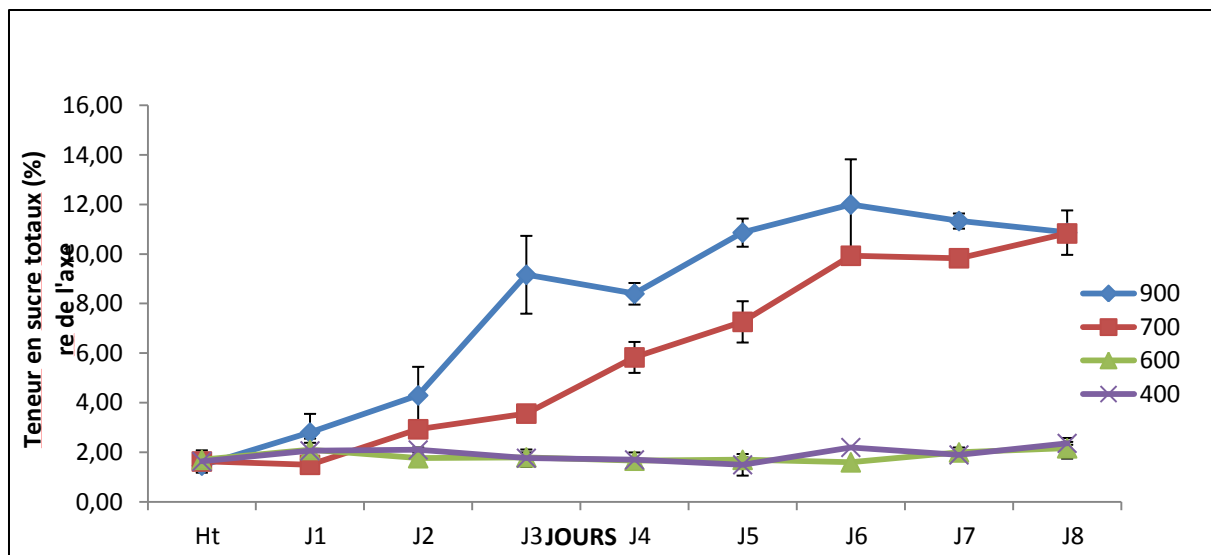


Figure 10: Evolution du BRIX au cours de la maturation post-récolte des fruits récoltés à différents stades de développement en vert chez la Cavendish.

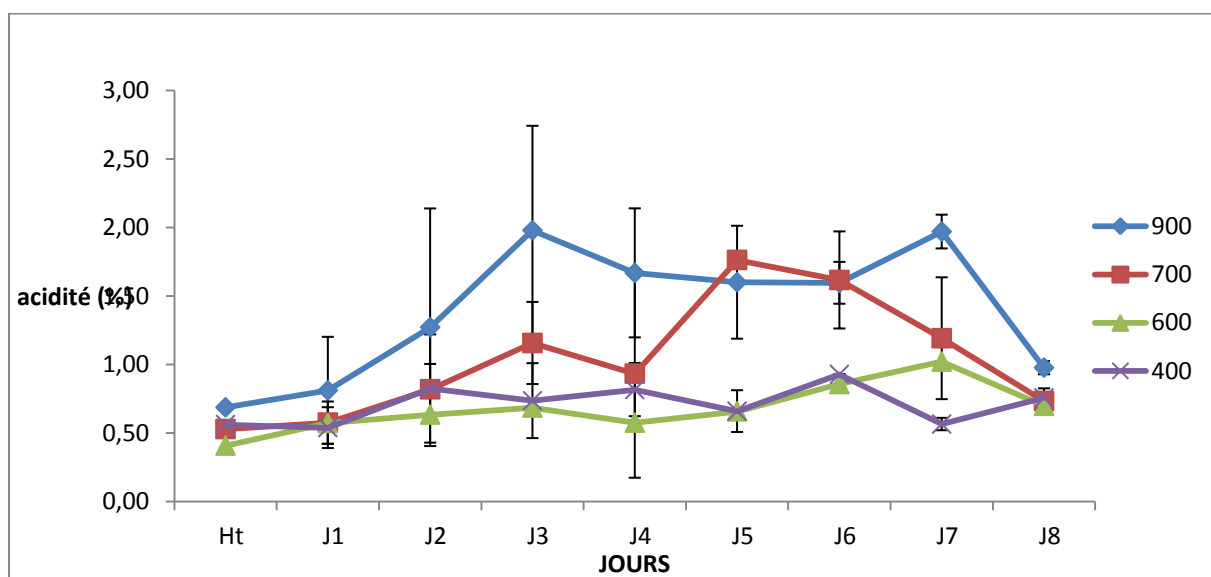


Figure 11: Evolution de l'acidité titrable au cours de la maturation post-récolte des fruits récoltés à différents stades de développement en vert chez la banane Cavendish.

Résultats

1. Analyse biochimique :

1.1 Evolution du BRIX :

Le BRIX permet d'évaluer la teneur en matière sèche soluble. Chez la banane le BRIX est couramment assimilé au saccharose qui en est la composante majeure.

L'analyse de l'évolution du BRIX au cours de la maturation post-récolte des fruits récoltés à différents stades de développement en vert chez la Cavendish montre une augmentation de la teneur en matière sèche soluble durant la maturation post-récolte pour les fruits récoltés à 900 et à 700 DJ. En effet, à 900DJ il est observé à J3 une teneur de 9,17 et à J6 une teneur de 12. Pour 700DJ, à J3 il est observé une teneur de 3,57 et à J6 une teneur de 9,93. En revanche aucune modification du BRIX n'est observée pour ceux récoltés à 600 et 700 DJ (figure 10).

Il semblerait qu'il y ait une différence d'intensité dans la réponse en fonction du stade de récolte. C'est-à-dire que plus le stade de récolte est tardif, plus la teneur en matière sèche soluble est élevée. Ceci pourrait être dû à la différence de force de réponse au traitement ou encore à la différence de teneur en précurseurs des matières sèche soluble.

Il semblerait être observé une différence en termes de temps de réponse en fonction du stade de récolte. En effet plus le fruit est récolté à un stade de développement en vert tardif et plus la valeur de son BRIX est élevée dans les phases tardives de la maturation.

1.2 Evolution de l'acidité titrable:

L'étude de l'acidité titrable permet de déterminer l'acidité d'une quantité précise de jus.

L'analyse de l'évolution de l'acidité titrable au cours de la maturation post-récolte des fruits récoltés à différents stades de développement en vert montre une augmentation de cette acidité pour les stades 900 et 700DJ avec deux pics d'augmentation à J3 de 1,98% et J7 de 1,97% pour le stade 900DJ et J3 de 1,16% et J5 de 1,76% pour le stade 700DJ (figure 11).

Aucune évolution de l'acidité titrable n'est observée pour les stades 600 et 400DJ.

Il semblerait avoir une augmentation transitoire de l'acidité titrable au cours de la maturation post-récolte avec pic acidité titrable d'autant plus précoce que le fruit est apte à répondre à l'éthylène (900 à J3, 700 à J5).

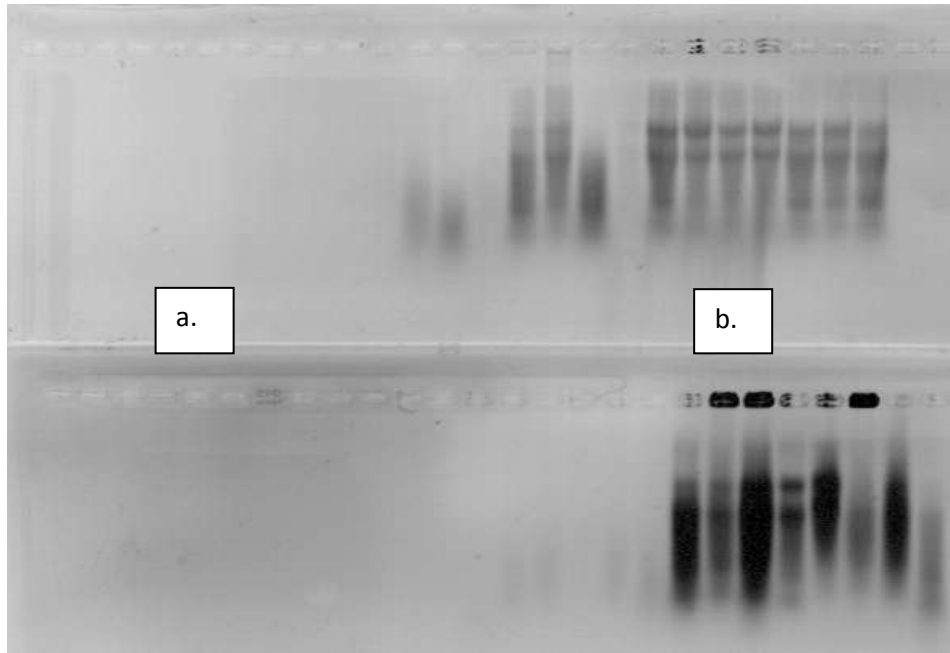


Figure 12: Analyse qualitative des ARN totaux par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant. a. Profils d'électrophorèse d'ARN totaux extraits au tampon d'extraction contenant du DIECA. b. ARN totaux extraits au tampon d'extraction sans sodium deoxycholate.

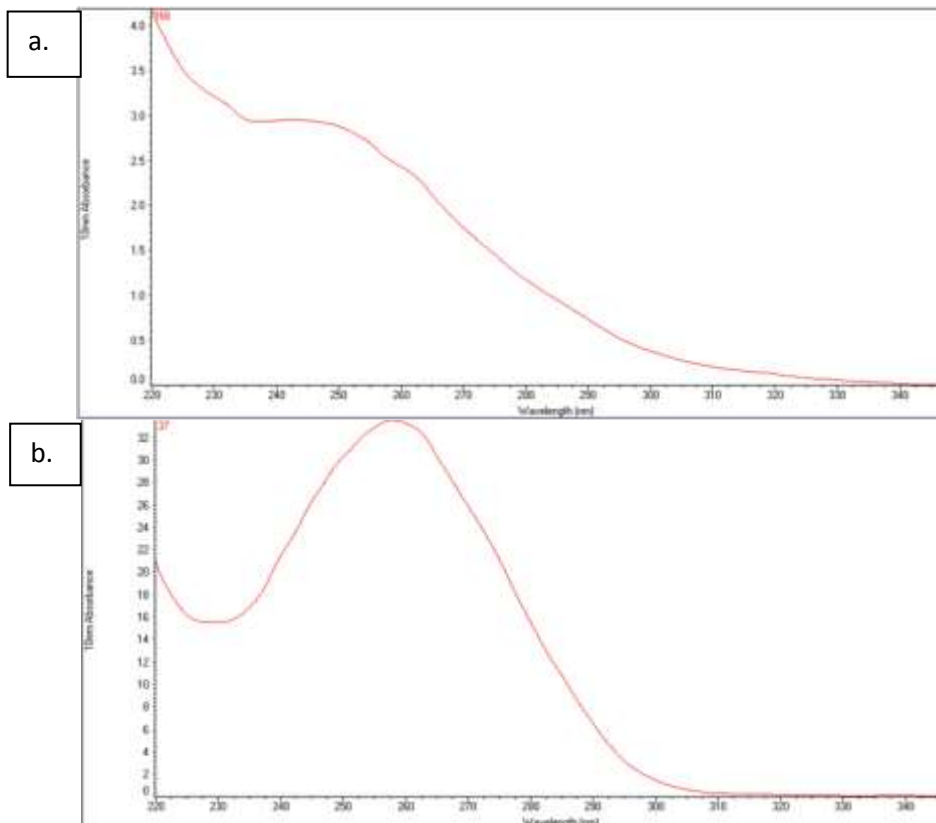


Figure 13: Courbe obtenue au nanodrop et représentative de deux types d'extraits d'ARN différents l'un dégradé (courbe a) et l'autre non dégradé (courbe b).

Ces études biochimiques sont un révélateur physico-chimique de l'état physiologique de la Cavendish.

Des analyses statistiques pour appuyer les tendances observées pour le BRIX et l'acidité titrable n'ont pas pu être effectuées faute d'un nombre de répétitions biologique suffisants.

2. Analyse moléculaire :

2.1 Extraction d'ARN :

Différentes versions de tampons d'extraction ont été préparées en fonction de la disponibilité des réactifs. Dans un premier temps, le DIECA a été utilisé à place du PVP 40 mais, ce tampon d'extraction s'est avéré inefficace en termes de rendement (figure 12). Dans un second temps le tampon d'extraction a été préparé comme indiqué dans la section Matériel et Méthode sans sodium deoxycholate, lequel s'est avéré aussi efficace que le tampon complet mais avec cependant un rendement moins élevé.

2.2 Analyse quantitative de l'extraction d'ARN :

La quantité d'ARN extrait pour les 274 échantillons a été mesurée par spectrophotométrie au moyen du Nanodrop. Une première évaluation de la qualité de l'extrait d'ARN a été réalisée via le calcul des indices de pureté par rapport aux protéines (rapport $DO_{260/280}$) et aux polysaccharides contaminants ($DO_{260/230}$). Un extrait d'ARN total est considéré comme pur lorsque ces indices sont au moins égaux à 2 et un pic à 260 nm (figure 13a.). Sur l'ensemble des 274 échantillons examinés, les concentrations d'ARN totaux obtenues ont été comprises entre 24.6 et 8524.1ng/ μ l avec des ratios $DO_{260/280}$ et $DO_{260/230}$ comprises respectivement entre 0,99 à 2,28 et -16,08 à 97,88.

Les résultats obtenus sont différents les uns des autres probablement à cause d'une non uniformité de manipulation. Il est généralement observé une absence de pic clairement différencié à 260 nm (figure 13b.) ou un ratio 260/280 en dessous de 1,5 lorsque la concentration d'ARN est trop faible ou de mauvaises qualités. Les extraits d'ARN qui ont présenté soit une concentration trop faible soit un ratio $DO_{260/280}$ en dessous de 1,5 ont été reprises.

2.3 Analyse qualitative de l'extraction d'ARN :

Les extraits d'ARN sont séparés par électrophorèse sur gel agarose en conditions dénaturante afin d'estimer leur qualité. Le gel révèle les sous unités ribosomiques dont les plus visibles

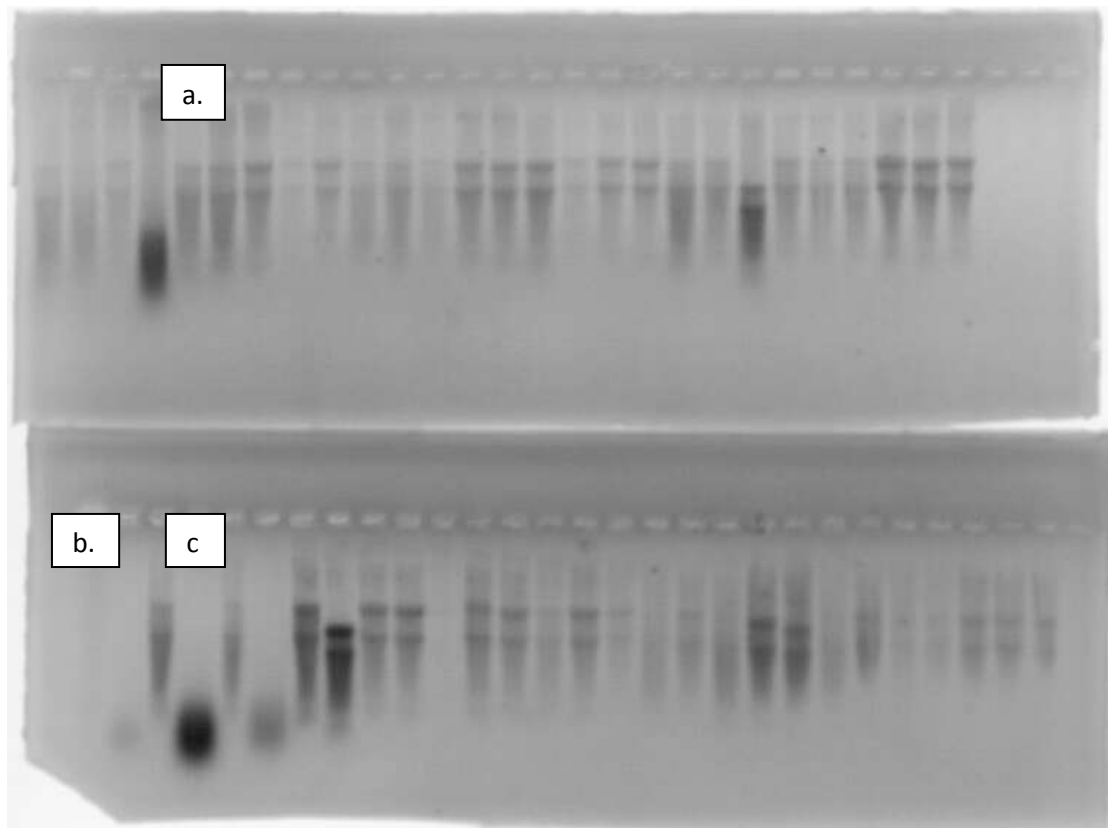


Figure 14: Gel d'agarose représentant la qualité de certains extraits d'ARN. a. ARN correcte. b. pas ou peu d'ARN présent. c. ARN non dégradé.

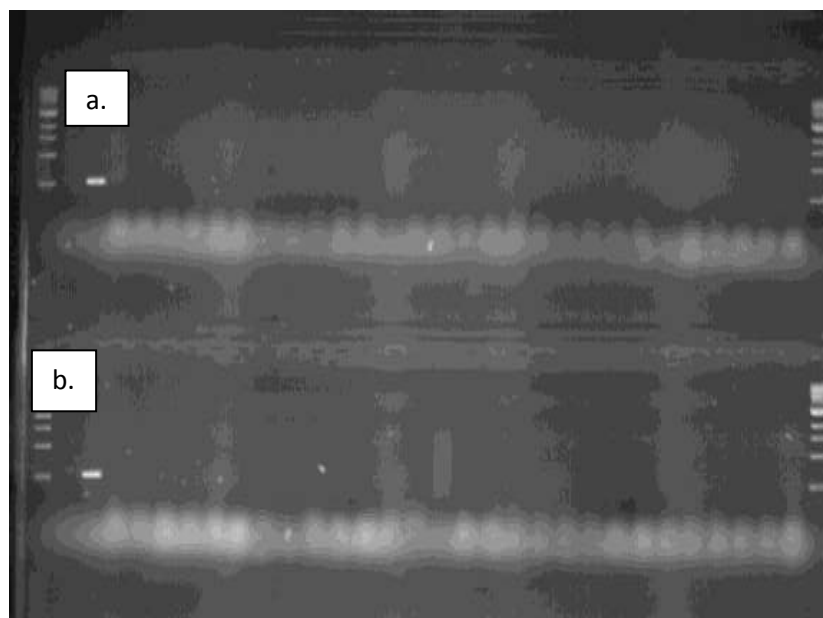


Figure 15: Résultats de l'amplification de l'actine pour la vérification du traitement DNase. Ladder 1Kb. a. témoin négatif. b. témoin positif.

sur gel sont les sous unités 18s et 25s. La sous unité 5s n'est pas observable car le gel n'est pas assez résolutif. Ainsi, différents cas de figures ont été observées, une bonne extraction lorsque les deux sous unités sont clairement différenciés (figure 14a.), peu ou pas d'ARN (figure 14b.) et un extrait d'ARN insuffisamment dénaturé (figure 14c.). L'extraction d'ARN a été reprise de nouveau lorsque qu'aucune trace d'ARN n'a été observée sur le gel, suggérant un faible rendement d'extraction, soit l'échec de l'extraction.

2.4 Vérification du Traitement DNase :

Un traitement à la DNase a été réalisé sur les extraits d'ARN totaux. Ce traitement permet d'éliminer d'éventuelle présence d'ADN contaminant, le protocole d'extraction ne prévoyant aucune étape spécifiquement dédiée à l'élimination des ADN. Il est important de faire ce traitement car les ARN vont être convertis par la suite en ADNc (ADN complémentaire) qui servira par la suite de matrice aux analyses d'expression par PCR au moyen d'une polymérase ADN dépendante. Il faut donc que seuls les ADNc issus des ARN soient représentés. Pour s'assurer du bon déroulement du traitement à la DNase, une PCR a été faite sur les extraits d'ARN traités à la DNase avec des amorces d'actine, un gène constitutivement exprimé. Cette PCR a été réalisée sur 88 échantillons pris au hasard en plus de deux témoins réactionnels contenant comme matrice de PCR de l'ADN de banane Cavendish traité (témoin négatif) et non traité (témoin positif) à la DNase. Aucune amplification de l'actine n'est détectée sur nos 88 échantillons (figure 15). La polymérase étant du type ADN-dépendante, n'amplifie que l'ADN, ainsi l'absence de produit d'amplification après une PCR directement réalisée sur l'extrait d'ARN traité à la DNase indique que l'absence d'ADN dans l'extrait d'ARN amplifié, par conséquent que le traitement à la DNase s'est déroulé proprement.

2.5 Obtention de d'ADN complémentaire :

Une reverse transcription a été faite afin d'obtenir des ADNc à partir des ARN totaux pour une future analyse transcriptionnelle par Q-PCR. Afin de s'assurer du bon déroulement de la reverse transcription, une PCR de vérification avec deux gènes de référence pour le tissu peau (CAC, SAMDC1) et deux gènes de référence pour le tissu pulpe (RAN, RSP2) a été réalisée. Le résultat obtenu a mis en évidence la présence d'un produit d'amplification de taille attendu chez tous les extraits analysés, indiquant ainsi la présence d'une matrice ADNc signe du succès de l'étape de reverse transcription (figure 16, voir verso p.27). Cependant, des bandes supplémentaires de taille inattendue ont été détectées dans les produits d'amplifications obtenus à partir des amorces pourtant spécifiques aux gènes SAMDC1 et RAN. Ces produits sont probablement le résultat d'une amplification aspécifique

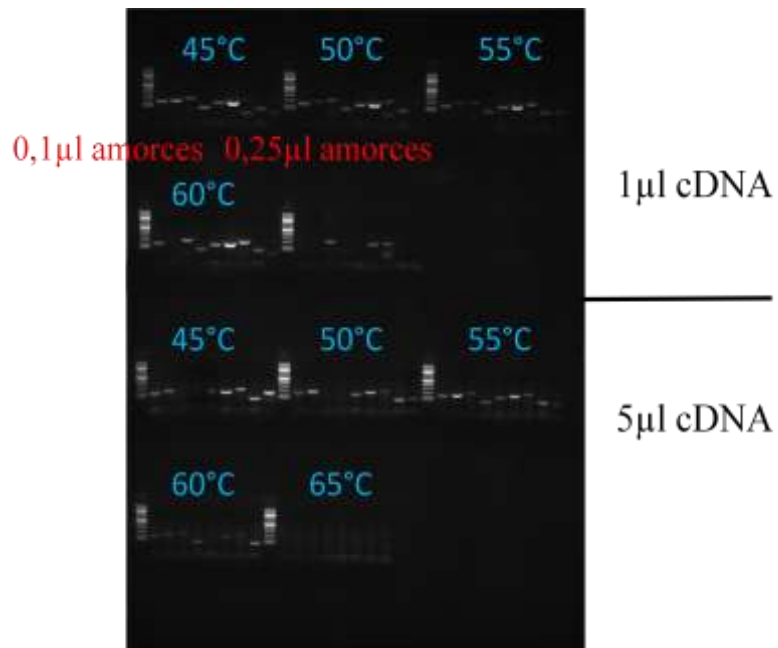


Figure 16: Amplification de gènes de référence pour tester les conditions PCR compatibles à l'ensemble des gènes utilisés. De la gauche vers la droite CAC, SAMDC1, RAN, RSP2.

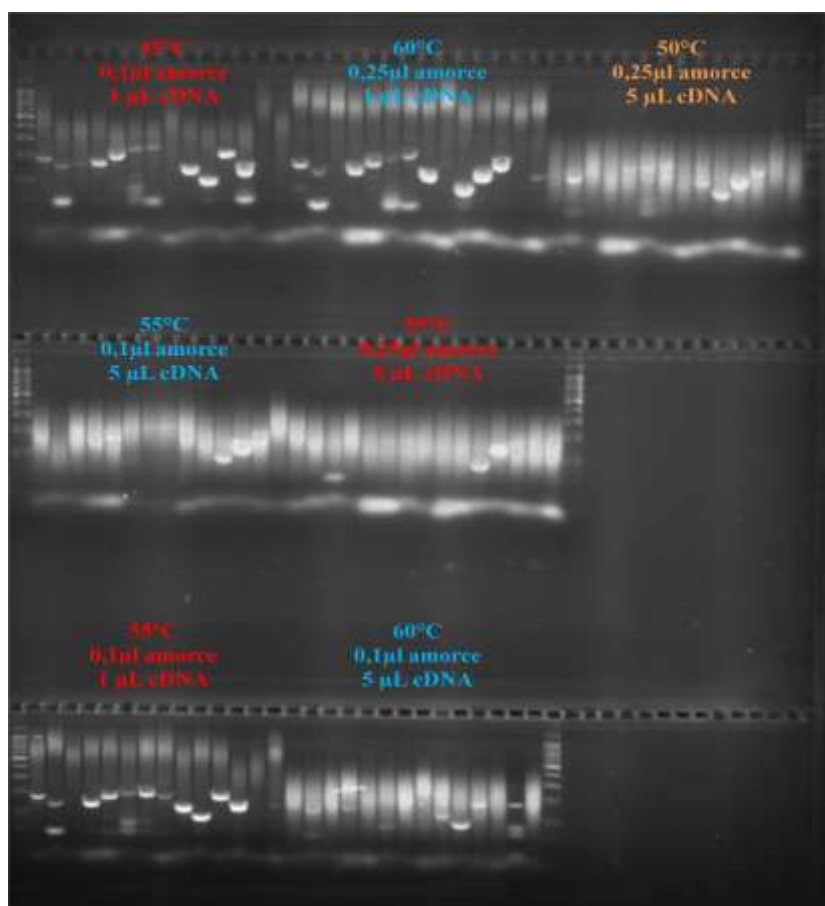


Figure 17: Amplification de gènes expérimentaux pour tester les conditions PCR compatibles à l'ensemble des gènes utilisés. De la gauche vers la droite CTR1, EIL6, EIL4, EIL4sp, EIL3, EIL2, EIL1, ACS, ACO, MS, ERS2, AcNa.

suggérant ainsi que les conditions de PCR appliquées à ces amorces nécessitent d'être optimisées.

2.6 Mise au point des conditions PCR compatibles à l'ensemble des gènes utilisés :

Dans un premier temps trois paramètres ont été testés, la température d'hybridation (45, 50, 55, 60 et 65°C), la quantité de matrice d'ADNc diluée au 4 ou 8^{ème} (1 ou 5µl) et la quantité d'amorce (0,1µl ou 0,25µl à 20µM chacune) avec les gènes de référence (CAC, SAMDC1, RAN, RSP2). La mise en commun des résultats a permis de définir sur la base ces trois paramètres (figure17), quatre conditions PCR décrites dans le tableau ci-dessous :

Paramètres	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4	Condition 5
T°C d'hybridation	45°C	50°C	55°C	60°C	60°C
Vol matrice cDNA	0,1µl	5µl	1µl	1µl	5µl
Vol amorces (20µM chaque)	0,1	0,25µl	0,1µl	0,25µl	0,1µl

Ces conditions ont été retenues car permettant l'amplification d'un fragment unique pour l'ensemble des gènes de référence testés dans notre étude.

Dans un second temps les conditions retenues précédemment sont testé pour des gènes expérimentaux (CTR1, EIL4, EIL4SP, ACS, ACO, MS, ERS3, AcNa). Après analyse du gel, les conditions finales retenues pour les analyses d'expression et également compatibles avec les gènes de référence sont les suivantes: température d'hybridation à 55°C, 1µl de matrice et 0,1µl d'amorces (figure 18).

Les conditions optimisées pour tous nos gènes en PCR classique ont ensuite été validées en Q-PCR.

2.7 Analyse de l'expression en Q-PCR :

La PCR quantitative a été utilisée pour examiner le niveau de messager des quatre gènes expérimentaux à savoir les gènes de malate synthase (MS) et aconitase (AcNa) potentiellement impliqués dans le métabolisme des acides organique et les gènes de biosynthèse de l'éthylène d'ACC oxidase (ACO) et d'ACC synthase (ACS) utilisés ici comme marqueurs des stades physiologiques. L'expression des gènes a été réalisée au cours

de l'évolution post-récolte des fruits Cavendish récoltés à 4 stades de développement en vert (400, 600, 700 et 900DJ), ainsi que chez 3 autres variétés de fruit (IDN 110, Pisang Lilin (PL) et Pisang Jary Buaya (PJB)) récoltés à maturité commerciale (équivalent à 900DJ).

2.8 Validation des conditions PCR classique en Q-PCR :

Après avoir mis au point, par PCR classique, les conditions optimales de PCR pour l'ensemble des gènes à étudier, celles-ci ont été testées en Q-PCR sur un certain nombre de gènes représentatif (de manière non exhaustive) de la diversité de niveau d'expression au cours de la maturation du fruit (voir tableau ci-dessous). Ces conditions ont été réalisées avec de l'ADNc de Cavendish pour les gènes suivants ; CTR1 (constitutive triple response), ACO (ACC oxydase), ACS (ACC synthase), MS (malate synthase), EIL4SP (facteur de transcription de type EIL, gène 4) et ERS3 (récepteur d'éthylène).

Gènes	ACO	ACS	AcNa	CTR1	EIL4	ERS3	MS
Niveau d'expression	++++ ¹	++ ¹	ND	+++ ²	+ ³	++ ⁴	++++ ⁵

¹ Liu XJ, Shiomi S, Nakatsuka A, Kubo Y, Nakamura R, Inaba A. 1999. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit. *Plant Physiology* 121: 1257–1265

² Hu HL, Do YY, Huang PL. 2012. Expression of a *MhCTR1* gene in relation to banana fruit ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* 56: 47-55

³ Mbéguié-A-Mbéguié D, Hubert O, Fils-Lycaon B, Chillet M, Baurens FC. 2008a. EIN3-like gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Grande naine). *Physiologia Plantarum* 133 : 435–448.

⁴ données non publiées

⁵ Pua EC, Chandramouli S, Han P, Liu P. 2003. Malate synthase gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Williams). *Journal of Experimental Botany*, 54(381) : 309-316,

Ainsi les conditions de PCR classique ont été vérifiées en qPCR.

2.9 Etude de l'efficacité des amorces pour les différentes variétés :

Les amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes ont été dessinées à partir des séquences de gènes isolés chez la variété Cavendish. Aussi, faut-il s'assurer de la comparabilité de l'efficacité de ces amorces entre toutes les variétés analysées IDN 110, PL et PJB.

L'efficacité des amorces a été mesurée simultanément par qPCR chez les variétés Cavendish, IDN110, PL et PJB, comme décrit dans la partie Matériel et Méthode.

Tableau 2: Bilan de l'efficacité des amorces par gène et par variétés en pourcentage.

Gènes/Variétés	Cavendish	IDN110	Pisang Liling	Pisang Jary Bouaya
ACO	100	100	86,17	100
ACS	92,36	84,27	37,1	100
RSP4	77,72	85,51	68,23	100
RSP2	90,01	92,07	92,1	100
SAMDC1	76,39	89,09	52,31	85,14
CAC	100	95,89	92,48	100
AcNa	100	90,51	88,1	100
MS	90,01	87,75	65,5	72,88

Tableau 3: Cycle d'amplification obtenu en Q-PCR pour le gène ACS pour la Cavendish (a.) au jour 1 et pour le gène ACO pour Pl au jour 2 (b.).

a.	ACS	Cavendish Pulpe Jour 1 (n°échantillon)	Répétion analytique 1	Répétion analytique 2
		4	20.867	18.3031
		5	23.099	21.3983
		6	23.0926	21.1432

b	ACO	PL Pulpe Jour 2 (n°échantillon)	Répétion analytique 1	Répétion analytique 2
		261	23.2803	23.0377
		262	20.6481	20.3122
		263	20.63	20.4603

Nos résultats Q-PCR (tableau 2) montrent une efficacité pour tous les gènes étudiés (2 gènes de références, CAC et SAMDC1 (pulpe) et RSP2 et RSP4 (peau), 2 gènes de marqueur physiologique (ACS et ACO) et 2 gènes expérimentaux (MS et AcNa) pour les variétés Cavendish, IDN 110 et PJB. En effet, nous avons une efficacité comprise entre 76,39% et 100% pour les gènes étudiés chez la Cavendish. Une efficacité entre 84,27% et 100% pour les gènes étudiés chez IDN110. Et une efficacité comprise entre 72,88% et 100% pour les gènes étudiés chez PJB.

Nous avons considéré ces efficacités comme comparables (proches), parce que supérieures à 70% chez l'ensemble des variétés avec une différence inter variétale n'excédant pas les 25%. En revanche il est observé une efficacité médiocre pour SAMDC1, ACS, RSP4 et MS chez la variété PL. L'efficacité obtenue pour SAMDC1 est de 52,31%, pour ACS 37,1%, pour RSP4 68,23% et pour MS 65,5%. De ce fait, il n'y aura qu'un seul gène de référence pour la variété PL pour la peau et la pulpe, un seul marqueur physiologique et la MS ne pourra pas être étudiée.

2.10 Analyse transcriptionnelle :

Après avoir validé les conditions optimales pour l'amplification de chaque gène et l'efficacité des amorces correspondantes, l'analyse transcriptionnelle a été réalisée dans un premier temps chez les fruits Cavendish, PL, IDN110 et PJB récoltés à maturité commerciale. Les résultats obtenus montrent une disparité de niveau d'amplification entre les répétitions biologiques. En effet, par exemple pour le jour 1 de la première répétition biologique chez la Cavendish pour le gène ACS il y a 20, 23 et 23 cycles d'amplification pour que le gène soit détectable (tableau 3a.). Ou encore pour le jour 2 de la première répétition chez PL pour le gène ACO 23, 20, 20 cycles d'amplification pour que le gène soit détectable (tableau 3b.). Cette variabilité aurait dû être observée des variations moins importantes entre répétitions biologiques. Cette disparité peut aussi bien traduire les différences entre les différentes répétitions biologiques auquel cas, il aurait fallu travailler sur un échantillon de tailles plus importante (5-6) ou tout simplement être le fruit d'erreur dans la gestion des échantillons.

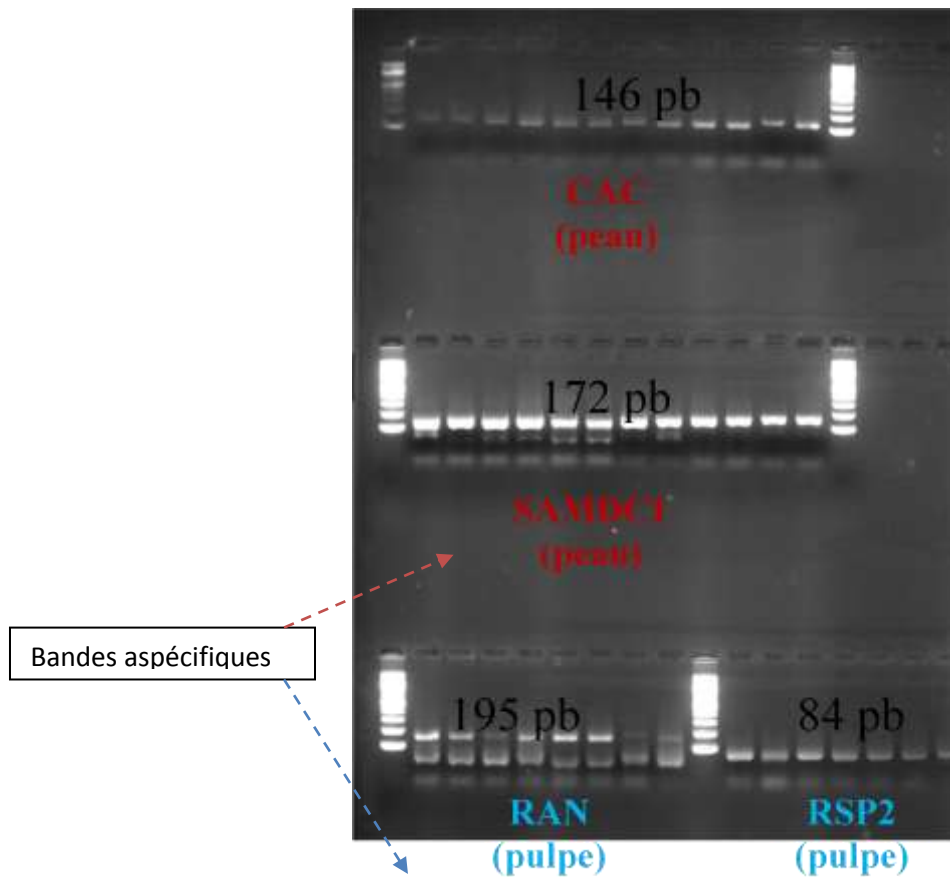


Figure 18: Résultat de l'amplification pour la vérification d'obtention de cDNA.
a.amplification de la peau avec des gènes de référence spécifique (CAC et SAMDC1).
b.amplification de la pulpe avec des gènes de référence spécifique (RAN et RSP2).

Discussion

Discussion sur les analyses biochimiques :

- BRIX et Acidité titrable :

Nos analyses montrent une augmentation de BRIX et d'acidité titrable au cours de la maturation pour les deux stades tardif de récolte (700 et 900 DJ). Nous avons vu précédemment que le taux de BRIX est assimilable à la teneur en saccharose. L'augmentation du taux de sucre au cours de la maturation correspondent aux résultats de Terra *et al.* (1983) et l'augmentation d'acidité correspond aux résultats de Palmer (1971) et de Mariott (1980).

De plus, ces augmentations ne sont pas observées pour les stades précoces (400 et 600 DJ). Néanmoins, un travail précédent, de l'équipe, effectué par O.Hubert, a mis en évidence la capacité du stade 600DJ à produire de l'éthylène et donc à répondre au traitement (communication personnel). Nous avons donc trois stades différents de maturation. Un stade 400DJ inapte à murir, un stade intermédiaire à 600 DJ capable de répondre partiellement à l'éthylène et un stade 700 et 900 DJ capable de murir.

Ces observations montrent que les différents facteurs sont induit différenciellement lors du processus de maturation (taux de sucre, production de l'éthylène, acidité titrable...). Une comparaison fine de ses quatre stades de maturation permettra de mettre en évidence les facteurs de réponse à l'éthylène ainsi que leur stade d'apparition dans la maturation. On pense notamment aux précurseurs capable d'hydrolysé l'amidon en sucres ou encore au taux d'expression génique influençant la maturation (malate synthase, aconitase, ...).

Discussion sur les résultats de biologie moléculaire :

- Efficacité des amorces :

Les résultats ont montré que les amorces dessinées à partir de la variété Cavendish avaient une bonne efficacité chez les variétés IDN110 et PL. Ce qui pourrait être expliqué par une forte similitude de ces gènes étudié entre les variétés. En revanche pour PJB l'efficacité est médiocre ce qui pourrait traduire une évolution/une disparité entre les génomes plus prononcé. Pour vérifier cela, nous pouvons proposer une analyse génétique avec un plus grand nombre de marqueurs.

- Analyse transcriptionnelle :

Les analyses obtenues en Q-PCR ne se sont pas révélées fiables. En effet, les écarts entre les amplifications pour une même répétition biologique sont trop importants. Ceci a traduit une grande variation intra-répétition et a donc remis en question le protocole d'échantillonnage.

Perspective

Dans cette étude, nous aurions aimé mieux comprendre la dynamique de la mise en place des acides organiques lors de la maturation de la banane et en particulier pour les gènes de la malate synthase et de l'aconitase. Cependant, nous ne sommes pas arrivés à répondre à cette problématique de départ. Nous en avons donc conclu que la variation intra-régime était importante. Ainsi le protocole de départ qui est adapté pour un échantillonnage non variable c'est retrouvé dans le cas présent inapproprié. En effet, un manque de répétitions biologique c'est fait ressentir tout au long de nos expérimentations. De plus aurait-il été plus judicieux de prélevé le même doigt entre chaque régime, c'est-à-dire, un fruit étant à la même position. Les biais environnementaux auraient-ils pu être mieux contrôlés. En effet, aurait-on pu choisir les régimes que l'on voulait chez le planteur, en faisant ainsi attention à l'homogénéité environnementale (altitude, pédologie, attendre l'intersaison pour éviter une trop grande variation de climat), l'homogénéité des pieds (condition physiologique « visuelle » équivalente).

Nous allons donc proposer un nouveaux protocole en incluant plus de répétitions biologique et un échantillonnage plus contrôlé pour éviter les biais d'évolution physiologique pour le même point de sortie et environnementale.

Protocole d'échantillonnage « idéale » pour les analyses de biochimie et de biologie moléculaire :

On veut :

- 1 variété Cavendish
- 6 répétitions biologiques par point de sortie
- 4 stades de récoltes (400, 600, 700, 900DJ)
- 9 point de sortie (de Ht à J8)

Totale du nombre d'échantillons à analyser : 648 qui comprend 216 échantillons pour les analyses de biochimie (Bioch) et 432 échantillons pour les analyse de biologie moléculaire (BM) (peau et pulpe).

On considère :

- 1 régime par point de sortie => 9 régimes
- 1 régime par répétition biologique => 6 régimes
- Au totale on prélève 54 régimes.

On prélève 2 doigts (pour Bioch et pour BM) par régimes pour chaque point de sortie.

- Pour éviter les biais on prélève par exemple 2 doigts médians internes de la 3^{ème} main.

Il va falloir faire attention à différents biais :

- Homogénéité environnementale (altitude, pédologie, attendre l'intersaison pour éviter une trop grande variation de climat).
- Homogénéité des pieds (condition physiologique « visuelle » équivalente).
- Avoir des échantillons comparables (prélèvement des mêmes doigts en fonction des différents régimes).

Deux possibilités d'obtenir des régimes, soit on les cultive sur les parcelles de Neufchâteau soit on demande au planteur de nous les fournir.

Ainsi, si on cultive les bananiers sur Neufchâteau on plante des bananiers du même âge sur une parcelle de 10m×10m. On y installe une station météorologique pour pouvoir calculer les stades de récoltes. Et on ne prend pas en considération les bordures pour les échantillonnages. En revanche si on fait appel à un planteur, nous allons choisir les différents régimes que nous voulons pour limiter les biais environnementaux et nous allons récolter les régimes aux stades de récoltes voulu.

Une fois les régimes récoltés il sera appliqué le même protocole que pour les manip de mon stage, c'est-à-dire, gazage à l'acétylène à 10000ppm/18h/20°C.

Estimation de la durée de l'expérimentation :

On a :

- 1 point de sortie par jour sur 9 jours
- 6 répétitions par point de sortie

On aura au minimum 12 fruits à échantillonner par jour et à stocker à -80°C.

Il a été mesuré par l'équipe une température moyenne de 23°C par jours ainsi :

- 400 = t_0
- 600 ~ $t_0 + 9$ jours
- 700 ~ $t_0 + 13$ jours
- 900 ~ $t_0 + 22$ jours

Pour les analyses de Bioch on se base sur une analyse de 108 échantillons en une semaine. Et pour les analyses de BM on se base sur une analyse de 274 échantillons sur 4 mois.

Ceci donne le chronogramme suivant:

	Biochimie			Bio Mol		
Total échantillons	équ. Jour	équ. Semaine	équ. mois	équ. Jour	équ. Semaine	équ. mois
432	10	2	0,44444444	192	38,4	6,4

[illegible]

Mois 2																															Mois 3			Mois 4		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	...	31	1	...	31	

[illegible]

Références bibliographiques

- Abadia J, Lopez-Millan A, Rombola A, Abadia A 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil* **241**: 75–86
- Agravante J.U, Matsui T, Kitagawa H, 1991. Sugars and organic acids in ethanol-treated and ethylene-treated banana fruits. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **38**: 441–444.
- Alvarez-Fernandez A, Paniagua P, Abadi'a J, Abadi'a A 2003. Effects of Fe deficiency chlorosis on yield and fruit quality in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J Agric Food Chem* **51**: 5738–5744.
- Bar Akiva A 1964. Visible symptoms and chemical analysis vs. biochemical indicators as a means of diagnosing Fe and manganese deficiencies in citrus plants. *Plant Anal Fert Probl* **4**: 9–24.
- Bartley I.M & Knee M, 1982. The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chem.*, **9**: 47–58.
- Bonhomme R 2000. Bases and limits to using “degree-day” units. *European Journal of Agronomy*, **13**: 1–10.
- Brady C.J 1987. Fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **38**: 155–178.
- Clarck R.B, Wallace A 1963. Dark CO₂ fixation in organic acid synthesis and accumulation in citrus fruit vesicles. *Proc Am Soc Hortic Sci* **83**: 322–331.
- Daniells J.W, Jenny C, Karamura D.A, Tomekpe K, Arnaud E & Sharrock S 2001. *Musalogue: a catalogue of Musa germplasm. Diversity in the genus Musa*. Montpellier, France, INIBAP.
- Degu A, Hatew B, Nunes-Nesi A, Shlizerman L, Zur N, Katz E, Fernie A, Blumwald E, Sadka A 2011. Inhibition of aconitase in citrus fruit callus results in a metabolic shift towards amino acid biosynthesis. *Planta* **234**:501–513.
- Erickson LC (1968) The general physiology of citrus. In: Reuther W, Batchelor LD, Webber HJ (eds) *The citrus industry*, vol 2. University of California, Riverside, 86–126
- Fernie A.R, Martinoia E 2009. Malate. Jack of all trades or master of a few. *Phytochemistry* **70**: 828–832.
- Frison E.A & Sharrock S 1998. The economic, social and nutritional importance of banana in the world. In: Picq C., Fouré E. & Frison E.A., eds. *Bananas and food security. International symposium, Douala, Cameroon*. Montpellier, France: INIBAP, 21–35.
- Grierson D, Tucker G.A & Robertson N.G 1981. The molecular biology of ripening. In: Friend J. & Rhodes M.J.C., eds. *Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables*. London: Academic Press, 149–160.
- Happi Emaga T, Wathelet B, Paquot M 2008. Changements texturaux et biochimiques des fruits du bananier au cours de la maturation. Leur influence sur la préservation de la qualité du fruit et la maîtrise de la maturation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12**(1): 89–98.
- Hentze MW, Kuh LC 1996. Molecular control of vertebrate Fe metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by Fe, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8175–8182.
- Heslop-Harrison J.S. & Schwarzacher T., 2007. Domestication, genomics and the future for banana. *Ann. Bot.*, **100**, 1073–1084.
- Huber D.J & Lee J.H 1986. Comparative analysis of pectins from pericarp and locular gel in developing tomato fruit. In: Fishman M. & Jen J., eds. *Chemistry and functions of pectins*. Washington: American Chemical Society, 141–156.
- Jackman R.L & Stanley D.W 1995. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **6**: 187–194.

- John M.A & Dey P.M 1986. Postharvest changes in fruit cell. *Adv. Food Res.*, **30**: 139-193.
- John P, Marchal J 1995. Ripening and biochemistry of the fruit. In: Gowen S, ed. Bananas and plantains. *Chapman & Hall*, 432-467.
- Jones D.R, 2000. *Diseases of Banana, Abaca and Enset*, Wallingford, UK. Stover R.H. & Simmonds N.W., 1987. *Bananas. Longman Scientific & Technical*, London, UK.
- Jullien A, Chillet M & Malezieux E. 2008. Pre-harvest growth and development, measured as accumulated degree days, determine the post-harvest green life of banana fruit. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **83** (4): 506–512.
- Jullien A, Malezieux E, Michaux-Ferriere N, Chillet M, & Ney B 2001b. Within-bunch Variability in Banana Fruit Weight: Importance of Developmental Lag Between Fruits. *Ann. Bot.* **87**:101-108.
- Kende H 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**: 283-307.
- Lakso A.N & Kliever W.M 1978. The influence of temperature on malic acid metabolism in grape berries. II. Temperature responses of net dark CO₂ fixation and malic acid pools. *Am. J. Enol. Vitic.* **29**: 145–149.
- Landsberg E.C 1986. Function of rhizodermal transfer cells in the FE stress response mechanism of *Capsicum annum* L. *Plant Physiol* **82**: 511–517.
- Lassoudière A 1979. Comportement de bananier Poyo au second cycle. I-Rejetonnage et multiplication végétative. *Fruits*. **34** (11) : 645-658.
- Lassoudière A 2007. Le bananier et sa culture. Ed. *Quæ, coll. Savoir-faire*
- Li M, Slaughte D.C & Thompson J.F 1997. Optical chlorophyll sensing system for banana ripening. *Postharvest Biol. Technol.*, **12**: 273-283.
- Lii C.Y, Chang S.M & Young Y.L 1982. Investigation of the physical and chemical properties of banana starches. *J. Food Sci.*, **47**: 1493-1497.
- Livak K.J, Schmittgen T.D 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time Quantitative PCR and the 2 $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lizada C 1993. Mango. In: Seymour G.B., Taylor J.E. & Tucker G.A., eds. *Biochemistry of fruit ripening. Chapman and Hall*, 255-271.
- Lassois L, Busogoro J.P, Jijakli H 2009. La banane : de son origine à sa commercialisation, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **13** (4): 575-586.
- Ma J 2005. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and Fe. *Crit Rev Plant Sci* **24**: 267–281.
- Madamba L.S.P, Baes A.U, Mendoza D.B 1977. Effect of maturity on some biochemical changes during ripening of banana (*Musa sapientum* L. cv. Lakatan). *Food Chem.*, **2**: 177-183.
- Marcku C & Jennings W.G 1987. Production of volatile by ripening bananas. *Journal of Agriculture and Food Chemestry*, **35**: 845-848.
- Mariott J 1980. Bananas. Physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. *CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, **13** (1): 41-88.
- Marriott J and Lancaster P.A 1983. Bananas and Plantains. *Handbook of Tropical Foods*, Chan, J.H.T. Ed: Marcel Dekker Inc., New York, 85-145.
- Mbida Mindzie C, Doutrelepont H, Vrydaghs L, Swennen R, Swennen R.J, Beeckman H, DeLanghe E & DeMaret P 2001. First archaeological evidence of banana cultivation in central Africa during the third millenium before present. *Veg. Hist. Archaeobot.* **10**:1-6.
- Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Romheld V 1999. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* **208**: 373–382.

- Omoaka P.O 2000. Postharvest physiology, ripening and quality evaluation in banana (Musa sp.) fruits. Doctoraatsproefschrift. Katholieke Universiteit Leuven. Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Departement Toegepaste Plantwetenschappen. N°445.
- Palmer J.K 1971. The banana. *The Biochemistry of Fruits and their Products*, (ed.A.C. Hulme), Vol.2, Academic Press, London.
- Peacock B.C 1972. Role of ethylen in the initiation of fruit ripening. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* **29**: 137-145.
- Peyret P, Perez P, Alric M 1995. Structure, Genomic Organization, and Expression of the *Arabidopsis thaliana* Aconitase Gene. *The Journal of Biological Chemistry*. **14**: 8131-8137.
- Pollefeys P, Sharrock S, Arnaud 2004. Preliminary analysis of the literature on the distribution of wild Musa species using MGIS and DIVA-GIS. Montpellier, France: INIBAP; 2004.
- Prasanna V, Prabha T.N & Tharananathan R.N 2007. Fruit ripening phenomena - an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **47**: 1-19.
- Pua E.C, Lee Y.C 2003. Expression of a ripening-related cytochrome P450 cDNA in Cavendish banana (Musa acuminata cv. Williams). *Gene* (in press).
- Redgwell R.J, Melton L.D, Brach D.J 1997. *In vivo* and *in vitro* swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta*, **203**: 162-173.
- Robinson J.C, 1996. Bananas and plantains. In: Atherton J, Rees A, eds. *Cambridge University Press*.
- Rouault TA, Klausner RD 1996. Post-transcriptional regulation of genes of Fe metabolism in mammalian cells. *J Biol Inorg Chem* **1**: 494-499.
- Sadka A, Dahan E, Or E, Roose ML, Cohen L 2001. A comparative analysis of mitochondrial citrate synthase gene structure, transcript level and enzymatic activity in acidless and acid-containing Citrus varieties. *Plant Physiol* **28**: 383-390.
- Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J & Vandamme E.J 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and application. *Adv. Appl. Microbiol.*, **39**: 213-294.
- Selvaraj Y, Kumar R & Pal D.K 1989. Changes in sugars, organic acids, amino acids, lipid constituents and aroma characteristics of ripening mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *J. Food Sci. Technol.*, **26**: 308-313.
- Seymour G., Taylor J.E. & Tucker G.A 1993. Banana. *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman and Hall, London, UK.
- Shimada T, Nakano R, Shulaev V, Sadka A, Blumwald E 2006. Vacuolar citrate/H symporter of citrus juice cells. *Planta* **224**: 472-480.
- Shimokawa K, Venda Y & Kasai Z 1972. Decarboxylation of oxalic acid during ripening of banana fruit (Musa sapientum L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, **36**: 2021-2024.
- Shlizerman L, Marsh K, Blumwald E, Sadka A 2007. Iron-shortage induced increase in citric acid content and reduction of cytosolic aconitase activity in Citrus fruit vesicles and calli. *Physiol Plant* **131**: 72-79.
- Simmonds N.W & Shepherd K 1955. Taxonomy and origins of cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of Botany* **55**: 302-312.
- Simmonds J.H 1963. Studies in the latent phase of *Colletotrichum* species causing ripe rots of tropical fruits. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science* **20**: 373-424.
- Sinclair W.B 1984. The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits. University of California, Oakland.
- Stover R.H. & Simmonds N.W., 1987. *Bananas*. London: Longman Scientific & Technical.
- Sweetman C, Deluc L, Cramer G, Ford C, Soole K 2009. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* **70** : 1329-1344.

- Terra N.N, Garcia E & Lajolo F.M 1983. Starch-sugar transformation during banana ripening: the behaviour of UDP glucose pyrophosphorylase, sucrose synthetase and invertase. *J. Food Sci.*, **48**: 1097-1100.
- Tress R & Drawer F 1973. Biogenesis of banana volatiles. *Journal of Agriculture Food Chemesty*, **21**: 560-565.
- Tress R & Jennings W.G 1972. Production of volatile compounds in the ripening banana. *Journal of Agriculture and Food Chemesty*, **20**: 189-192.
- Tse C & Capeau 2002. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps reel. *Ann Biol Clin*, **61**: 279-93.
- Tucker G.A & Grierson D 1987. Fruit ripening. In: Davies D.D., ed. *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise, vol. 12, Physiology of metabolism*. London: Academic Press, 265-319.
- Ueda Y & Ogata K 1976. Changes of oxalates in banana fruit during ripening. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **23**: 311-315.
- Wade N.L and Bishop D.G 1978. Changes in the lipid composition of ripening banana fruits and evidence for an associated increase in cell membrane permeability. *Biochimica et Biophysica Acta*, **529**: 454-464.
- Wallace A 1971. Regulation of the Micronutrient Status of Plants by Chelating Agents and Other Factors. Edwards Bros Inc., Los Angeles, CA.
- Yang S.F & Hoffman N.E 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 155-189.

Références internet :

- | | |
|--------------|---|
| FAO | http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx |
| INABAP | http://bananas.bioversityinternational.org/ |
| Météo France | http://climatheque.meteo.fr/Docs/DJC-methode.pdf |
| ODEADOM | http://www.odeadom.fr/ |
| UGPBAN | http://www.bananegueloupemartinique.com/bonne-pour l'économie |

